Prólogo

MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL

La gran barrera entre moléculas de gran potencial terapéutico y su frustrado empleo como fármacos reside en muchas ocasiones en la imposibilidad de una administración eficaz. La nanotecnología se ha convertido en una fiel aliada de las ciencias farmacéuticas, permitiendo una administración de fármacos eficaz, sostenida y localizada según las necesidades del paciente y la naturaleza del fármaco.

El desarrollo de la nanotecnología farmacéutica ha permitido que todo un arsenal de fármacos de escasa estabilidad, difícil administración, elevada toxicidad o con características que requieran ser específicas para un individuo, puedan ser accesibles como fármacos.

El gran esfuerzo de muchos investigadores ha derribado parte de las barreras para hacer de un buen compuesto *in vitro* un potencial fármaco *in vivo* al ser administrado al paciente, y esta excelente monografía que tiene como titulo: «*Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*» da cuenta de las muchas posibilidades que ya existen y del prometedor futuro que espera a esta disciplina dentro del área de ciencias de la salud.

La actual monografía ha podido realizarse gracias a la financiación de la Real Academia Nacional de Farmacia, y la Fundación Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia pero sobre todo al empeño de Don José Luis Vila Jato, Académico de Número de esta Real Institución, quien ha sido el coordinador de la misma y contando con la colaboración de excelentes científicos para dar una visión actual de este tema esencial para comprender el desarrollo futuro de la administración de fármacos.

La nanotecnología farmacéutica con la aplicación de micelas, liposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, nanocristales, ciclodextrinas, dendrímeros, nanopartículas metálicas y otros tipos de estrategias para ad-

ministrar los fármacos convencionales o los de origen biotecnológico a sus lugares específicos de acción, reduciendo los efectos secundarios, habla necesariamente un lenguaje multidisciplinar. Los ingenieros de materiales, los químicos orgánicos, los físicos y por supuesto coordinados por los farmacéuticos, son esenciales para comprender todo el proceso y llevarlo a buen puerto. Curiosamente los farmacéuticos que desde siempre se han preocupado por la biodisponibilidad de los fármacos, su estabilidad y su administración para mayor eficacia y comodidad del paciente, se encuentran ahora frente a una nueva etapa. La nanotecnología farmacéutica es simplemente una etapa más en la administración racional de fármacos que necesita un cambio de mentalidad, posiblemente de menor envergadura que la que fue necesaria para admitir los medicamentos inyectables, y la necesidad de las condiciones de esterilidad, pH, o concentración de iones que se necesitan para este tipo de administración farmacéutica.

Son muchos los aspectos nuevos relacionados con el propio riesgo al utilizar las nanopartículas dependiendo de sus naturaleza y del modo como alcanzan el interior del organismo. Habrá que analizar en profundidad como medir los niveles alcanzados y que es lo que se considera dosis cuando es por vía inhalatoria o transdérmica. Sin olvidar cuales van a ser los procedimientos para evaluar la seguridad de los diversos nanosistemas farmacéuticos. Como vemos la historia acaba de empezar y sin lugar a dudas va a ser muy productiva y creativa ofreciendo amplias posibilidades para un mejor uso de fármacos y luchar de forma más racional frente a la enfermedad y el sufrimiento humano.

La monografía comienza con un magnífico Capítulo de Introducción donde el Dr. Vila Jato nos pone en antecedentes de la transformación profunda que ha sufrido la tecnología farmacéutica para hacer frente al reto de la administración de nuevas moléculas procedentes de la biotecnología y que incluyen péptidos, proteínas, oligonucleótidos y un largo etc. que se incrementan de año en año entre los aceptados por las Agencias Europea y Americana del Medicamento, EMEA y FDA. Pasa también revista a los diferentes nanosistemas que se pueden emplear actualmente para la liberación de fármacos y cuáles son los más adecuados en diversas patologías. Los aspectos biofarmacéuticos de aclaramiento de los nanosistemas y la importancia de los conjugados en las diferentes formas de aplicación son analizados en profundidad y permiten predecir la importancia de este tipo de aplicaciones en el futuro.

Los siguientes seis Capítulos, desde el Capítulo dos al siete están incluidos en la primera parte dedicada a: *Biomateriales y técnicas utilizadas en nanotecnologia farmaceutica*, donde grupos especializados en diferentes procesos y técnicas hacen un esfuerzo de puesta al día de los temas específicos.

El Capítulo 2 hace una amplia presentacion de los: *Nanosistemas a base de poliésteres* y sus autores F. Rocha Formiga, E. Ansorena, A. Estella-Hermoso, E. Imbuluzqueta, D. Gonzalez y M.J. Blanco, desarrollan todas las posibilidades de estos compuestos que constituyen tal vez los polímeros mas frecuentemente utilizados por estar, algunos de ellos, autorizado su empleo por las agencias regulatorias.

El Capítulo 3 está dedicado a *Nanosistemas a base de polisacáridos: quitosano* y son sus autores F. Goycoolea, C. Remuñan y M.J. Alonso, con un recorrido por la nueva utilidad de estos polisacáridos antes ignorados, excepto por los estudiosos de las ciencias básicas.

El Capítulo 4 da una visión actual de los *Nanosistemas lipídicos* y son sus autores D. Torres y B. Seijo los cuales nos introducen en el campo de los liposomas que constituyen, hasta el momento actual, los nanosistemas farmacéuticos mas estudiados y que han alcanzado éxito en su utilización clínica.

El Capítulo 5 introduce nuevos compuestos y conceptos al uso, los *Dendrimeros y sus aplicaciones biomédicas*, sus autores T. Gonzalo, y M.A. Muñoz-Fernández nos permiten profundizar en estos nuevos polímeros, que ofrecen posibilidades por su carácter multifuncional a nivel de superficie, y que son objeto de intensas investigaciones que han dado lugar a que algunos de ellos se encuentren en fase de ensayo clínico o en avanzadas fases preclínicas.

El Capítulo 6 está dedicado a los *Nanocristales* y es su autor R. Martínez Pacheco el cual introduce una nueva visión de las posibilidades que ofrecen para fármacos muy poco solubles cuando éstos se emplean a escala nanométrica

El Capítulo 7, que cierra la primera parte, está dedicado a *Nanoparticulas metálicas: Oro* y son sus autores S. Al-Qadi y C. Remuñán-López, curiosamente se muestra como el oro, ancestral fármaco, está alcanzando un nuevo valor y utilidad terapéutica.

La segunda parte se recoge bajo el epígrafe de *Aplicaciones Farmacoterapéuticas* y contienen tres Capítulos, los números 8, 9, y 10.

El Capítulo número 8 está dedicado al *Cáncer* y son sus autores el Dr. Vila Jato y P. Calvo. Este capítulo recoge de modo amplio y al mismo tiempo preciso las grandes innovaciones que ha permitido la nanotecnología en el tratamiento y detección precoz del cáncer.

El Capítulo 9 nos introduce en el mundo de las *Nanovacunas* y son sus autores S. Vicente, A. Sánchez y M.J. Alonso. Las grandes innovaciones que permiten la administración de vacunas, incluidas en nanopartículas, por nuevas vías

como aerosoles por vía nasal o pulmonar es uno de los aspectos que es importante destacar y donde está incluida información muy novedosa acerca de la inmunización a nivel de superficie de mucosas o la potenciación de antígenos incluidos en nanopartículas.

El Capítulo 10 y último de la Monografía tiene por título *Otras aplicaciones farmacoterapéuticas,* cuyo autor es J. M. Irache ofrece una amplia visión de todas las posibilidades que encierra la nanotecnología, particularmente en campos como enfermedades infecciosas, diabetes, osteoporosis, analgesia, etc.

Es de agradecer el esfuerzo realizado por todos los autores que nos permiten tener información de primera mano y entrever lo que será el futuro en la administración de fármacos. Esta Monografía es importante para mentes curiosas que quieran conocer la evolución de la administración de fármacos, independientemente de sus estudios o disciplina de origen. Para los farmacéuticos tiene la virtud de actualizar sus conocimientos, lo que es siempre necesario. Para los que trabajan en las ciencias de tecnología farmacéutica esta Monografía les permite conocer cómo se encuentra el conocimiento en el campo del saber que han escogido. Finalmente para los más jóvenes que empiezan a interesarse por el mundo del medicamento desearles que la lectura de esta Monografía estimule su curiosidad y les ofrezca el nuevo reto de todo lo que esta pendiente de hacer. En nanotecnología farmacéutica ellos pueden ser creadores e innovadores en la ciencia de la administración de fármacos. Ciertamente es una ciencia/arte tan antigua como la idea de paliar el sufrimiento humano, pero siempre tan joven como cada uno de los que se incorporan a su estudio.

MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL

Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia

1. Introducción

JOSÉ LUIS VILA JATO
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Los principios activos son en general inadecuados para su administración al organismo sin que éstos sean incluidos en un vector por lo que la Farmacia ha desarrollado las llamadas formas farmacéuticas adaptadas a las diferentes vías de administración. Toda la galénica tradicional ha constituido un arte asombroso a lo largo de muchos siglos pero la moderna revolución farmacéutica conmocionó la Medicina y cambió la vida de los hombres al permitir la elaboración de medicamentos a escala industrial y que éstos pudiesen llegar a importantes poblaciones de pacientes. A pesar de su elaboración a escala industrial en la primera mitad del siglo XX la formulación de los medicamentos se puede considerar como un simple modus operandi, un hágase según arte, y no una verdadera ciencia. Pero en la década de los años 1950 figuras como el estadounidense Higuchi, el suizo Münzel y en España el profesor Cadórniga comienzan a considerar que la tecnología farmacéutica tiene una sólida base fisicoquímica cuyos principios deben ser tomados en consideración a la hora de incluir un principio activo en una formulación farmacéutica.

La década de los años 1960 supone la introducción de los conocimientos de la Biofarmacia y Farmacocinética los cuales provocaron una profunda transformación en la Farmacia Galénica al considerarse como imprescindible el conocimiento de los eventos del medicamento en el organismo humano (medio biológico) lo que supuso que los criterios biofarmacéuticos pasasen a representar un papel primordial en la formulación y desarrollo de las diferentes formas de dosificación. La aplicación de los principios fisicoquímicos y los conocimientos aportados por la Biofarmacia y la Farmacocinética han supuesto que la Tecnología Farmacéutica, aun conservando el término de tecnología, sea considerada actualmente como una verdadera ciencia.

En la respuesta producida por los medicamentos se deben considerar dos aspectos: tiempo que permanece el fármaco en su lugar de acción (aspecto temporal) y cantidad de fármaco que llega a su diana terapéutica (aspecto espacial). Las formulaciones convencionales no permiten controlar éstos dos aspectos por lo que mayoritariamente en la década de los años 1980 se desarrollaron nuevas estrategias y sistemas que tenían como finalidad conseguir una optimización de la liberación del principio activo con el objetivo de modificar el aspecto temporal, por medio de lo que actualmente se conoce como liberación controlada, dando lugar al desarrollo de nuevas formas de dosificación de medicamentos y a la administración de éstos a través de nuevas vías como la nasal, transdérmica, colónica, pulmonar, etc.

La última transformación profunda que ha sufrido la Tecnología Farmacéutica es una consecuencia de la necesidad de disponer de nuevas formas de dosificación adecuadas para el creciente número de moléculas terapéuticas procedentes del desarrollo de la Biotecnología. Estas moléculas, entre las que se incluyen péptidos, proteínas, fragmentos de anticuerpos, oligonucleótidos, etc representan un crecimiento muy importante ya que si en el año 2000 constituían el 25% de los medicamentos presentados ante la EMEA actualmente representan el 50% debido, en parte, al fuerte descenso experimentado por entidades químicas que supongan unas aportaciones realmente innovadoras.

En las últimas décadas ha tenido lugar un espectacular desarrollo de la biologia celular y molecular que ha permitido no solo un mejor conocimiento de la fisiopatologia de numerosos procesos patológicos sino también la identificación de diversas dianas terapéuticas con el consiguiente desarrollo de nuevos fármacos cuya estructura va desde sencillas moléculas a complejas macromoléculas como proteínas o plásmidos. Estas moléculas, tal como se recoge en la Figura 1.1, pueden tener actualmente un variado origen pero con frecuencia presentan problemas de solubilidad y, para alcanzar una adecuada biodisponibilidad biofásica (en fármacos con elevada actividad intrínseca puede ser suficiente un 10%), deben poseer unas propiedades fisicoquímicas que les permitan atravesar las barreras fisiológicas, como son los epitelios, membranas celular y nuclear, así como ser estables tanto física como químicamente en fluidos biológicos.

Obviar éstas barreras fisiológicas, bioquímicas y farmacéuticas se ha convertido en el centro de atención de la ciencia de liberación de fármacos al organismo por medio de lo que actualmente se conoce como vectorización de fármacos ya que modificando las características farmacocinéticas y de biodistribución de los principios activos es posible aumentar su eficacia y restringir la toxicidad asociada a su biodistribución en tejidos en los que no interesa que se alcancen determinados niveles de fármaco.

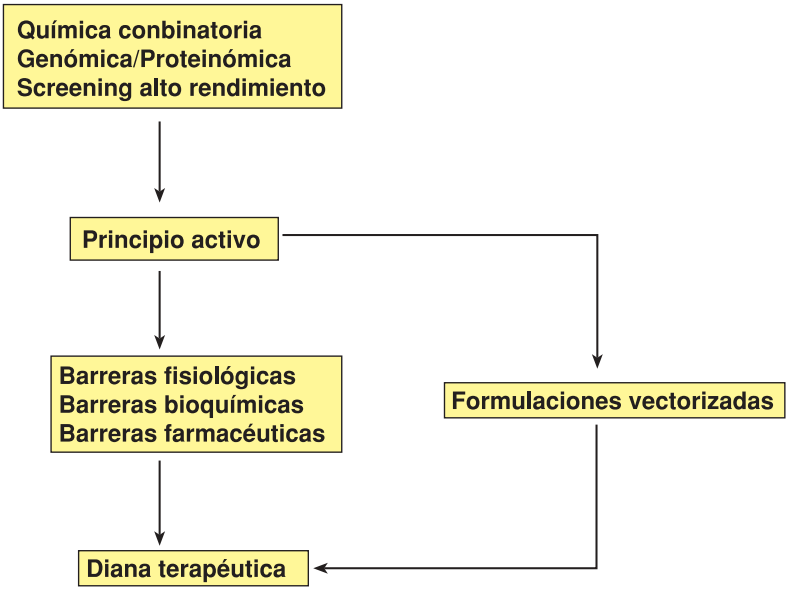


FIGURA 1.1. *Esquema de cómo las formulaciones vectorizadas permiten que el principio activo que contienen pueda alcanzar su diana terapéutica obviando las diferentes barreras que se oponen para la obtención de una adecuada biodisponibilidad biofásica.*

¿Cómo se hace tradicionalmente para llevar una substancia activa a su diana terapéutica? Salvo algunas excepciones ésta tarea se adjudica a un transportador como la sangre que tiene los defectos de sus cualidades: va por todas partes por lo que no elige sus destinatarios. La idea de la vectorización pasa entonces, utilizando la sangre como transporte, por incluir el fármaco en unas estructuras que, al alcanzar la diana terapéutica, liberan el fármaco que contienen. Piénsese en la cabeza de un alfiler y luego imaginemos estructuras cien mil veces más pequeñas que son introducidas en el cuerpo humano con el fin de diagnosticar o curar enfermedades. Lo que podría ser el capítulo de una novela fantástica de viajes intracorporales con naves nanoscópicas, ahora se ha convertido en un tema de investigación de importante actualidad gracias a una disciplina que se conoce con el nombre de nanotecnología.

La aplicación de la nanotecnología a las ciencias biomédicas supone unas mejores oportunidades de diagnóstico y unas terapéuticas más efectivas lo que ha llevado a acuñar el término de Nanomedicina cuyo objetivo, según la Plataforma Española de Nanomedicina, sería el desarrollo de aquellas prácticas médicas, incluyendo la prevención, el diagnóstico y la terapia que requieren tec-

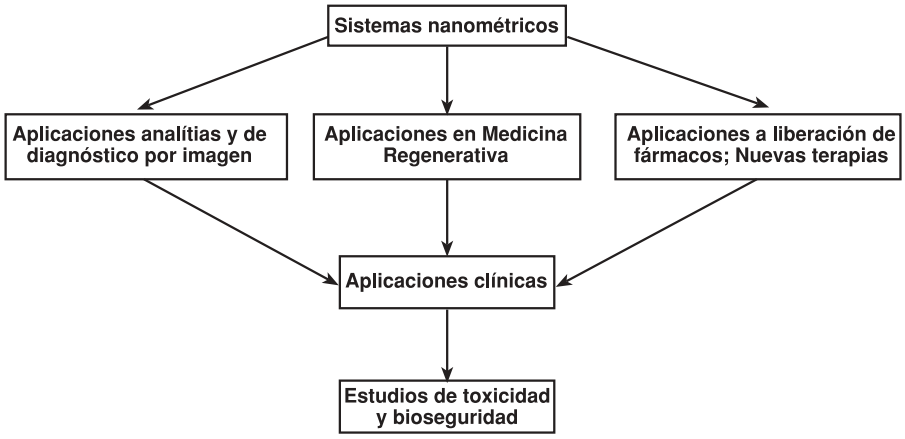


Figura 1.2. *Áreas de actuación derivadas de la aplicación de los nanosistemas en Biomedicina.*

nologías basadas en interacciones entre el cuerpo humano y materiales, estructuras o dispositivos cuyas propiedades se definen a escala nanométrica. En ésta definición se incluye el uso de herramientas analíticas para conocer mejor las bases moleculares de las enfermedades así como el diseño de sistemas nanométricos (de 1 a varios cientos de nanometros) de liberación de fármacos que permitan terapéuticas más eficaces.

En los últimos años ha tenido lugar un espectacular desarrollo de las nanotecnologias particularmente aplicadas al área biomédica y así el Instituto Nacional de la Salud de EE.UU. estima que para el año 2010 más del 50% de los avances en las ciencias biomédicas corresponderán al sector nanotecnológico; por otra parte algunos autores, tal vez de forma exagerada, llegan a fijar el año 2015 como fecha para que el cáncer sea considerado como una patología crónica.

La Plataforma Europea de Nanomedicina, dependiente de la Fundación Europea para la Ciencia, ha publicado en noviembre de 2006 la Agenda Estratégica de Investigación en Nanomedicina en la que se incluyen las áreas de actuación de la Nanomedicina con el empleo de sistemas nanométricos (Figura 1.2) así como las prioridades, para los próximos años, en diagnóstico, vectorización de fármacos y medicina regenerativa.

La estimación realizada por el Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos, que anteriormente se ha mencionado, se basa en las siguientes previsiones:

- Desde el punto de vista de la industria farmacéutica alcanzar una eficiente liberación del fármaco se considera como una característica esencial del producto y principalmente para las nuevas moléculas biotecnológicas en las que complejas barreras limitan su éxito clínico. Incluso, para los fármacos ya existentes, la industria farmacéutica busca nuevas formulaciones que aumenten el ciclo vital del fármaco mediante unas mejores características o nuevas indicaciones con respecto a las existentes. Esta estrategia de bajo riesgo/ alta rentabilidad centra el problema en la liberación del fármaco ya que los riesgos inherentes a su utilización son conocidos.
- Estudios farmacoeconómicos realizados en ensayos clínicos oncológicos revelan que las nuevas formulaciones nanotecnológicas de antineoplásicos pueden resultar altamente competitivas frente a las clásicas formulaciones. Por ejemplo, con las formulaciones de doxorubicina en liposomas, el coste global del tratamiento es mas bajo al requerirse una menor frecuencia de administración y ser menores las intervenciones para disminuir los efectos secundarios. En general se espera que el uso de sistemas nanotecnológicos será favorable en aquellos casos en que la vectorización del fármaco es crucial para su eficacia y reducir sus efectos secundarios, aspectos especialmente relevantes en la terapéutica oncológica y de las infecciones severas.
- Los éxitos alcanzados por compañias como Sequus Pharmaceutical, Liposome Company y Gilead en la aplicación de los liposomas a la clínica han permitido adquirir en el plano tecnológico un profundo conocimiento de la preparación industrial de liposomas convencionales y estericamente estabilizados así como de su comportamiento in vivo. Ello ha dado lugar a que en la actualidad se encuentren en fase clínica de desarrollo 29 formulaciones de liposomas conteniendo agentes citostáticos, antiinfecciosos y analgésicos. Estas buenas perspectivas se han trasladado también al campo de las nanopartículas poliméricas con la aprobación clínica de una formulación (Abraxane®) y otras que se encuentran en diversas fases de desarrollo clínico así como poner de manifiesto que éstos nanosistemas presentan ventajas frente a los liposomas ya que los polímeros son mas económicos que los lípidos y presentan una mayor versatilidad fundamentalmente en el aspecto multifuncional.

La Nanotecnología Farmacéutica, como ciencia de los sistemas nanoparticulares farmacéuticos, cuenta con una larga trayectoria en la preparación y caracterización de vehículos portadores de fármacos si bien ha sido en los últimos

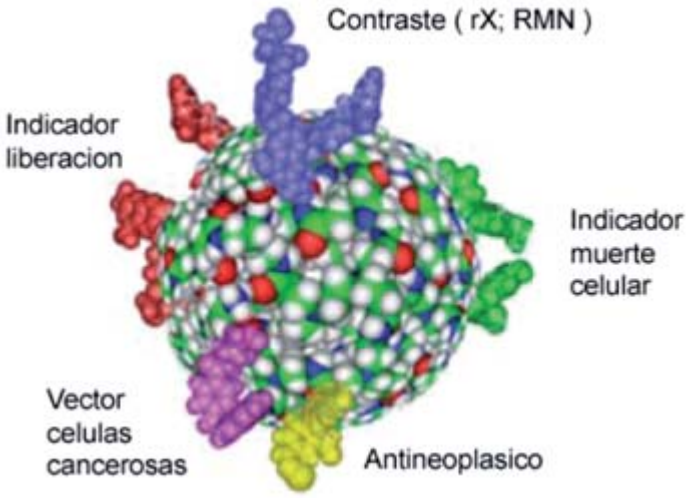


Figura 1.3. *Esquema de un nanosistema multifuncional capaz de identificar células cancerosas y liberar el citostático.*

años cuando se han producido las innovaciones y aplicaciones terapéuticas más interesantes. En la década de los años 1970 se realizaron las primeras administraciones de liposomas y nanopartículas conteniendo diversos fármacos a animales de experimentación pero solo hasta la década de los años 1990 no ha sido posible disponer en clínica de las primeras formulaciones de liposomas conteniendo fármacos antifúngicos.

A lo largo de más de 30 años de intensas investigaciones se han cubierto diferentes etapas que van desde la simple encapsulación del principio activo hasta la obtención de sistemas nanométricos multifuncionales que no solo contienen el principio activo sino también otros elementos que permiten su orientación hacia dianas terapéuticas específicas, visualización del fármaco y seguimiento de su actividad (Figura 1.3).

Un buen ejemplo de éstos sistemas multifuncionales lo constituye el llamado por Kogure y col sistema MEND (multifuncional envelope-type nano device) constituido por una cubierta lipídica sobre la cual se fijan cadenas de PEG, lipidos facilitadores como DOPE, ligandos de vectorización y péptidos fusógenos como octaarginina o estearil arginina.

Si nos ceñimos más concretamente a los sistemas de liberación de principios activos tendríamos que señalar los que se recogen en la Figura 1.4. Den-

FIGURA 1.4. *Diversos nanosistemas que se pueden utilizar actualmente para la liberación de fármacos.*

tro de éstos nanosistemas son los liposomas, nanopartículas, micelas poliméricas, vectores de ADN, conjugados poliméricos y dendrímeros los que se encuadran dentro del campo que constituye lo que actualmente se conoce con el nombre de Nanotecnología Farmacéutica y con los que es posible conseguir algunas de las finalidades siguientes:

- Proteger al fármaco de su degradación, tanto física como química, aspecto esencial cuando se piensa en la utilización de los nuevos principios activos procedentes del área de la biotecnología.
- Incrementar la absorción de fármacos facilitando su difusión a través de los epitelios, aspecto de importancia relevante cuando se trata de buscar alternativas a la administración parenteral de fármacos.
- Modificar las características farmacocinéticas de los fármacos y con ello su perfil de distribución a ciertos tejidos u órganos bien para incrementar su eficacia o disminuir efectos indeseables.
- Incrementar la penetración y distribución intracelular que son necesarias cuando la diana sobre la que va a actuar el fármaco se encuentra en el interior de la célula.
- Mejorar las técnicas de imagen y diagnóstico in vivo.

Si nos referimos a las posibilidades de nuevas terapéuticas también resulta ser enorme la relevancia de la nanomedicina en campos como cáncer, procesos infecciosos, vacunas, trastornos metabólicos, trastornos autoinmunes y rechazo de trasplantes, procesos inflamatorios y dolor.

Cáncer: Se busca fundamentalmente un incremento de la eficacia y disminución de la toxicidad controlando la biodistribución e incrementando la penetración intracelular. Los nanosistemas mas utilizados son nanopartículas, liposomas, y micelas bién como tales o estéricamente estabilizados.

Infecciones: Aumentar la eficacia y disminuir la toxicidad controlando la biodistribución, facilitando la absorción a través de mucosas, mejorando la protección frente a la degradación (especialmente en el caso de péptidos antigénicos) e incrementar la penetración intracelular particularmente a macrófagos, células presentadoras de antígenos, células dendríticas.

Trastornos metabólicos: Prestar una adecuada protección frente a la degradación de péptidos y proteínas, mejorar la absorción a través de mucosas y controlar la liberación para que ésta sea sostenida en el tiempo.

Trastornos autoinmunes: Controlar la biodistribución hacia el sistema inmunitario y/o a células inflamatorias así como conseguir una liberación sostenida.

Tratamiento del dolor: Mejorar la biodisponibilidad del fármaco al sistema nervioso central y conseguir una liberación sostenida.

Terapia génica: Condensar fármacos derivados del ADN, protegerlos de su degradación, mejorar la captación intracelular y dirigirlos hacia los compartimentos citoplasmáticos o nuclear.

Los liposomas, micelas y nanopartículas poliméricas han sido ampliamente estudiados y poseen las características mas adecuadas para la encapsulación de fármacos, genes y agentes de contraste. Al igual que sucede con otros nanosistemas, como los dendrímeros, los mencionados anteriormente pueden ser modificados en su superficie con el fin de conferirles diversas propiedades y funcionalidades, entre las cuales conviene señalar:

- Incrementar el tiempo de permanencia en sangre del nanosistema, y con ello poder conseguir una vectorización pasiva, recurriéndose frecuentemente a recubrir los nanosistemas con PEG de peso molecular 2.000 a 5.000 Da.
- Posibilitar el reconocimiento específico y unión a tejidos o células diana por medio de ligandos específicos como anticuerpos monoclonales, aptámeros, fragmentos Fab, ácido fólico o transferrina.

- Posibilitar la liberación del fármaco en función de determinadas características fisiológicas o patológicas como pH y temperatura; para ello se asocian al nanosistema componentes sensibles a éstas condiciones.
- Posibilitar la penetración en el interior de la célula por medio de los llamados péptidos fusógenos y que el fármaco sea protegido de la degradación lisosomal cuando la diana terapéutica se localiza en el interior de la célula.
- Posibilidad de obtener nanosistemas multifuncionales conteniendo por ejemplo un fármaco y un agente de diagnóstico.

En general los nanosistemas farmacéuticos deben cumplir con las siguientes especificaciones:

- Deben ser biocompatibles y biodegradables, especialmente los destinados a su administración por una vía parenteral.
- Tener un tamaño de partícula nanométrico.
- Poseer una elevada capacidad de incorporación del principio activo.
- Presentar un prolongado tiempo de circulación en el torrente circulatorio.
- Es deseable que el sistema presente una específica o inespecífica capacidad de acumulación en determinados lugares del organismo.

Los liposomas son vesículas artificiales de fosfolípidos con un tamaño comprendido entre 50-500 nm que pueden ser cargados con un elevado número de fármacos hidrosolubles y, en algunos casos, también con fármacos hidroinsolubles al colocarse éstos entre las cadenas fosofolipídicas. Durante mas de 20 años los liposomas se han considerado como prometedores nanovehículos por ser inertes, biocompatibles y prácticamente carentes de reacciones tóxicas y antigénicas así como proteger los principios activos del medio externo. El uso de los liposomas dirigidos, es decir aquellos que se acumulan selectivamente en determinados órganos o tejidos, aumenta la eficacia del fármaco incluido en el liposoma y disminuye la captación de fármaco por parte del sistema reticuloendotelial. Bajo ésta perspectiva se han desarrollado muchos protocolos de trabajo para fijar vectores, incluyendo anticuerpos, sin que se vea afectada la integridad del liposoma ni las propiedades del anticuerpo; sin embargo la utilización de liposomas puede verse comprometida por su corta semivida en plasma pudiéndose solventar éste problema con el empleo de liposomas recubiertos con cadenas de PEG a las que se fija el anticuerpo.

El desarrollo de nanovehículos para fármacos poco solubles es un aspecto importante por las multiples implicaciones que se presentan entre las cuales tenemos la baja absorción y biodisponibilidad, agregación en el torrente circulatorio cuando se administran por vía i.v. y, por otra parte, por su carácter lipofílico, pueden atravesar la membrana celular y alcanzar importantes dianas intracelulares. Con objeto de incrementar la hidrosolubilidad de fármacos poco solubles se ha sugerido el empleo de micelas poliméricas con tamaños de 5 a 100 nm así como, utilizando ciertos copolímeros bloque, es posible incrementar la semivida en plasma. Por otra parte, y debido a su pequeño tamaño, presentan el efecto EPR tal como se ha demostrado con micelas conteniendo adriamicina las cuales se acumulan más en tejido tumoral que en tejidos normales. También es posible insertar ligandos específicos que puden unirse covalentemente al bloque hidrofílico exterior con lo que el fármaco se libera en el tejido específico mientras que la estabilidad de las micelas permiten mantener solubilizado el fármaco con la consiguiente reducción de la toxicidad debida a una menor interacción con los tejidos que no son diana del fármaco.

Las nanopartículas poliméricas por su pequeño tamaño y la posibilidad de funcionalizar su superficie pueden ser orientadas hacia localizaciones o células diana específicas tras su administración por vía i.v. o subcutánea lo que se traduce en una mejora de la imagen en ciertas situaciones patológicas, aumentar la eficacia terapéutica o disminuir los efectos secundarios de los fármacos que contienen. Algunos tipos de nanopartículas han sido modificados para que puedan responder a estímulos ambientales (cambio de pH del medio), estímulos bioquímicos, aplicación de calor o de campos magnéticos rápidamente oscilantes. Estas modificaciones ofrecen la posibilidad de controlar la integridad de la nanopartícula y la velocidad de liberación del principio activo dentro de determinadas estructuras celulares.

El desarrollo de las diferentes tecnologías que se emplean para la preparación de los diversos nanosistemas farmacéuticos no constituyen actualmente el único objetivo de la Nanotecnología Farmacéutica ya que también interesa conocer los factores que como tamaño, carga superficial o hidrofobicidad de la superficie condicionan su cinética de eliminación y biodistribución. La mayor parte (más del 90%) de los nanosistemas inyectados por vía endovenosa son capturados por el sistema reticuloendotelial del hígado y bazo (SER) tras sufrir una opsonización por parte de componentes plasmáticos. Ello representa una excelente oportunidad para dirigir fármacos como antibióticos o antivirales para tratar infecciones intracelulares; en éste sentido las nanopartículas constituyen un adecuado vehículo para fármacos antiparásitos intracelulares como Leishmania donovani causante de la leishmaniosis de tal forma que el rápido acla-

ramiento hepático y bazo restringe la acumulación en otros órganos y reduce su toxicidad.

Aunque la captura de nanosistemas por parte del sistema reticuloendotelial representa una circunstancia favorable para algunos fármacos sin embargo para otros, cuya diana no se situa a nivel hepático o del bazo, se convierte en una limitación por lo que se han desarrollado procesos mediante los cuales se modifica la hidrofobicidad de la superficie del nanosistema, permitiendo que permanezcan largo tiempo en el torrente circulatorio y conseguir una vectorización efectiva en otros tejidos diferentes del hepático o bazo.

ASPECTOS BIOFARMACÉUTICOS

La Nanotecnología Farmacéutica, como ciencia y tecnología de los sistemas nanoparticulares, presenta cada vez, sin olvidar su fuerte base fisicoquímica, un mayor componente biológico ya que en ella intervienen nuevos aspectos biofarmacéuticos y farmacocinéticos.

El comportamiento biofarmacéutico de los nanosistemas farmacéuticos presenta características específicas y diferentes a la de los principios activos que contienen. Tal como se recoge en la Figura 1.5 las macromoléculas, al ser inyectadas i.v. al organismo, pueden sufrir una degradación por la acción de enzimas específicos o bien, si van en vectores que las protegen, éstos pueden sufrir una agregación o adhesión a componentes plasmáticos. La biodistribución de las macromoléculas depende de la estructura de la pared de los capilares sanguíneos, condiciones fisiológicas o fisiopatológicas de los tejidos, aporte sanguíneo y linfático y propiedades fisicoquímicas del vector.

Las interacciones con biofluidos y el acceso al fluido intersticial constituyen las barreras extracelulares con las que se encuentran los nanosistenas administrados por vía i.v. y que son determinantes para su biodistribución. Una importante limitación de los nanosistemas farmacéuticos es que el organismo los trata como partículas extrañas por lo que son rápidamente opsonizadas y eliminadas del torrente circulatorio antes de que puedan cumplir su función. Por ello una de las propiedades mas importantes de todo nanosistema es poseer una elevada semivida plasmática aspecto que sigue siendo fundamental y con desarrollo en la investigación biomédica. Existen diversas razones para conseguir nanosistemas con elevados tiempos de permanencia en la circulación sanguínea siendo una de ellas el poder mantener un adecuado y sostenido nivel de fármaco en plasma ya que ello permite que los nanosistemas o agregados macromo-

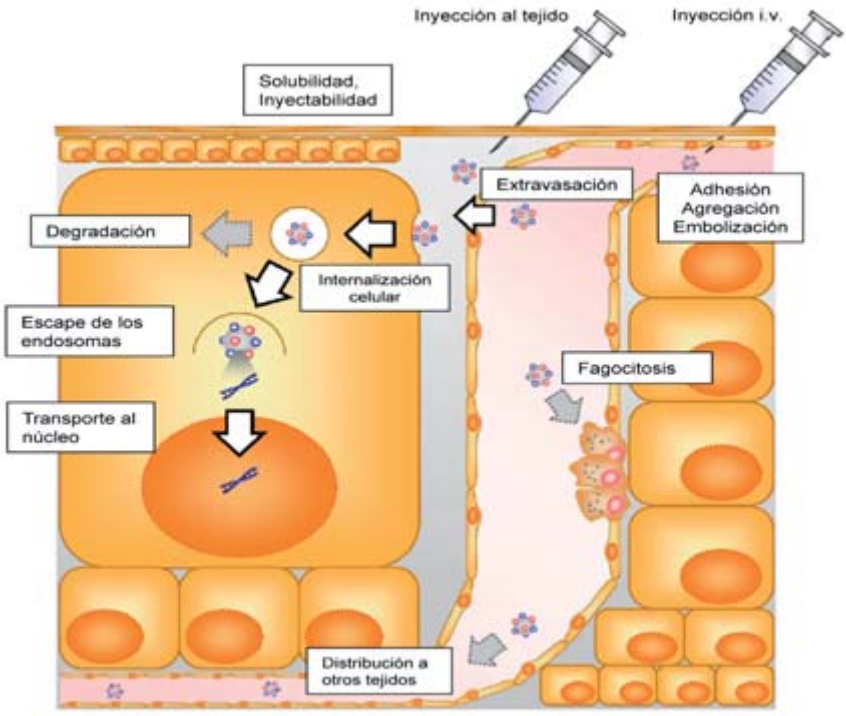


Figura 1.5. *Problemas biofarmacéuticos asociados a la administración de nanosistemas farmacéuticos.*

leculares, fundamentalmente proteínas, se puedan acumular en zonas de elevada permeabilidad vascular y facilitar la liberación del fármaco en estas zonas. Igualmente, los nanosistemas vectorizados con ligandos específicos, tienen mayor tiempo para interaccionar con sus dianas terapéuticas específicas al pasar la sangre un mayor número de veces por ellas.

Un aspecto de gran interés para poder administrar los liposomas, y en general de todos los nanosistemas, ha sido el conocimiento de las causas por las que se produce su rápido aclaramiento del torrente circulatorio; aunque aun no está perfectamente conocido parece ser que está relacionado con la interacción que se produce con las lipoproteínas de alta densidad las cuales actúan removiendo las bicapas lipídicas del liposoma lo que facilita la adsorción o inclusión de opsoninas como la fibronectina, a-2 macroglobulina, etc que juegan un importante papel en el reconocimiento de los liposomas y otras partículas por parte de los macrófagos y el SRE (Figura 1.6).

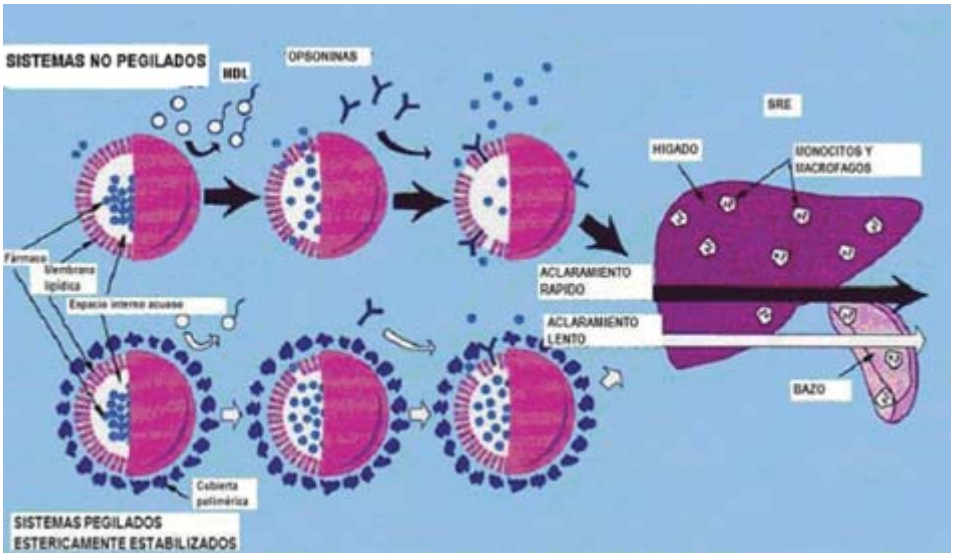


FIGURA 1.6. *Aclaramiento de nanosistemas pegilados y no pegilados vía sistema reticuloendotelial (SRE) en hígado y bazo.*

La cinética del aclaramiento de los nanosistemas y su biodistribución no solo depende de su hidrofobicidad sino que también intervienen el tamaño y la carga superficial. Precisamente el pequeño tamaño de los liposomas que constituyen la formulación de Ambisome® (< 100 nm) permite que una importante fracción de la dosis inyectada escape del inmediato aclaramiento por parte de los macrófagos del hígado y riñón. Con objeto de conseguir una formulación de anfotericina mas farmacoeconómica que Ambisome® se ha comercializado la especialidad Abelcet® en la cual se ha reducido 3 veces la cantidad de lípidos si bien no puede competir en términos de actividad. Las formulaciones basadas en niosomas, constituidas por surfactantes poliméricos, son más económicas que las de lípidos, biodegradables, no son inmunogénicas y parecen una buena alternativa al igual que nanopartículas de poliepsiloncaprolactona conteniendo anfotericina B las cuales han mostrado una actividad similar a Ambisome® en candidiasis sistémica en ratones neutropénicos.

La natural tendencia de los nanosistemas a ser captados por el sistema reticuloendotelial supone una excelente oportunidad para realizar una vectorización pasiva de fármacos hacia los macrófagos presentes en hígado y bazo y es utilizada para la liberación de antineoplásicos en hepatocarcinomas o metástasis hepáticas procedentes de tumores ginecológicos, broncopulmonares o del

tracto digestivo. Actualmente se encuentra en ensayo clínico una formulación de nanopartículas de isohexilcianoacrilato conteniendo doxorubicina (Transdrug); éstas nanopartículas son rápidamente captadas por el sistema fagocítico mononuclear lo que provoca una elevada adsorción en la superficie celular y un elevado gradiente de doxorubicina que, al incrementarse su difusión intracelular, sobrepasa la capacidad detoxificante del sistema glicoproteína P.

La captura selectiva de los nanosistemas no modificados por parte de células fagocíticas se ha utilizado para la liberación intracelular de antibióticos y antivirales en infecciones intracelulares. Como ejemplo de los primeros fármacos podemos mencionar la formulación de amikacina en liposomas (Mikasome®) que ha mostrado una actividad entre 2 a 6 veces mayor que la amikacina en modelos de tuberculosis en raton pero que ha presentado problemas en los ensayos clínicos. Las nanopartículas constituyen unos sistemas adecuados para contener fármacos antiparasitarios para el tratamiento de la leishmaniasis; así, por ejemplo, nanopartículas de poliisohexilcianoacrilato cargadas con primaquina incrementa 21 veces la actividad del fármaco frente a L. donovani; igualmente, utilizando el mismo polímero, la toxicidad de la dehidroemetina se reduce notablemente en el tratamiento de la leishmaniasis visceral.

La modificación de la superficie de los liposomas, micelas poliméricas, niosomas, nanopartículas, etc ha constituido la siguiente etapa en el desarrollo de los nanosistemas farmacéuticos con la finalidad que éstos puedan poseer diferentes propiedades o desarrollar ciertas funciones. A mediados de la década de los años 90 se descubre que el recubrimiento de los liposomas con polímeros hidrofílicos permite obtener los llamados liposomas estericamente estabilizados que no son reconocidos por los macrófagos ni eliminados por el SRE lo cual permite que su aclaramiento del torrente circulatorio sea lento y su permanencia en el organismo se aumente considerablemente.

Como polímeros protectores los PEG ofrecen una atractiva combinación de propiedades: excelente hidrosolubilidad, elevada flexibilidad de sus cadenas, baja toxicidad e inmonugenicidad, ausencia de acumulación en SRE y mínima influencia sobre las propiedades farmacológicas del fármaco que se incluye en el nanosistema. Los PEG no se metabolizan y los de peso molecular inferior a 40 kDa son excretados por vía renal siendo empleados los de peso molecular comprendido entre 1.000 y 20.000 kDa para el recubrimiento de nanosistemas.

Todas éstas características de los PEG han determinado que en los últimos años haya tenido lugar una importante modificación de sus cadenas para conseguir sistemas con larga semivida plasmática, una vectorización o terapia gé-

nica (como se verá posteriormente). En la Tabla 1.1 se recogen algunas de las modificaciones que se han realizado en las cadenas de PEG de nanosistemas.

A nivel biológico el recubrimiento de nanosistemas con moléculas de PEG impide la interacción con ciertos componentes sanguíneos y reduce la unión de proteínas plasmáticas lo que conlleva una disminución de la fijación de opsoninas y su captura por parte del sistema retículo endotelial. El mecanismo por el cual las cadenas de PEG previenen la opsonización es múltiple y no del todo conocido pero están en juego factores como aumento de la hidrofilia de la superficie del nanosistema, disminución de la carga superficial, aumento de las interacciones repulsivas entre componentes sanguíneos y nanovehículos y que la formación de la capa polimérica sobre la superficie del nanosistema la hace impermeable para macromoléculas como las opsoninas incluso a bajas concentraciones.

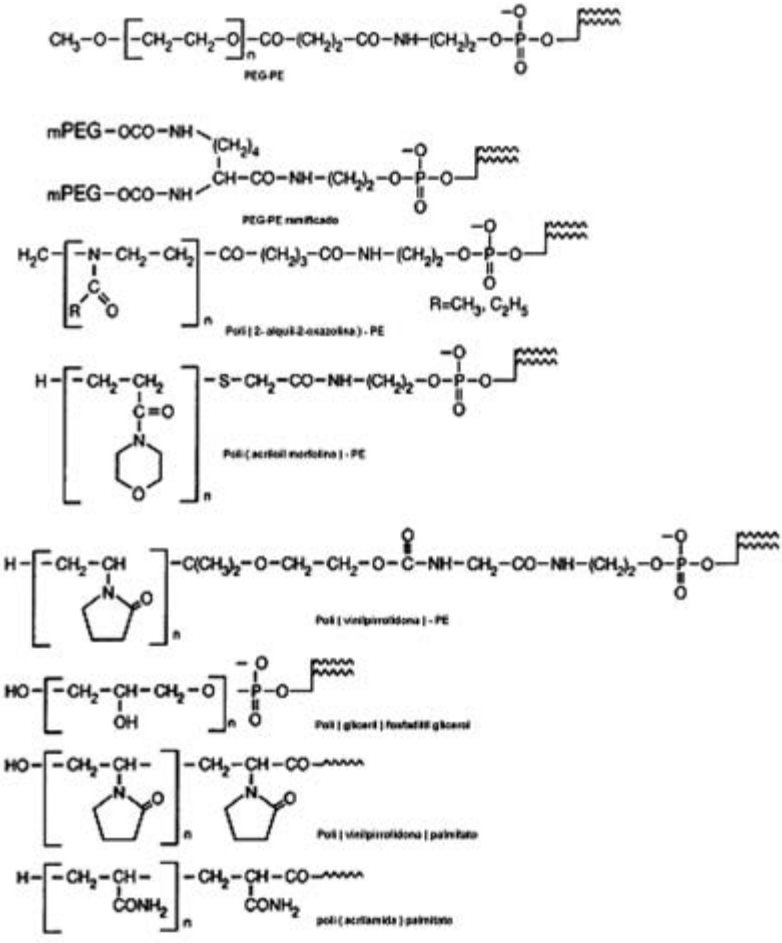
TABLA 1.1. *Ejemplos de modificaciones en las cadenas de PEG en nanosistemas*

Modificaciones	*Aplicaciones*
Conjugado PEG-poli(ε caprolactona)	Nanoencapsulación de fármacos lipofílicos
PEG-Péptido-DOPE	Terapia génica
PEG-gelatina modificada	Terapia génica
Péptidos fusógenos-PEG-PEI	Terapia génica
Folato.PEG-poliaspártico	Micelas pH sensibles
PEG-PLA-copolímeros dibloque anfifílicos	Micelas termosensibles

Las últimas investigaciones acerca del recubrimiento de liposomas con PEG se dirigen hacia la síntesis de derivados de PEG con grupos terminales ácidos o alcohólicos o bien de derivados de PEG que permitan la pérdida del grupo polar y favorezcan la liberación del material encapsulado en determinadas condiciones. En la Tabla 1.2 se recogen algunos de los polímeros que pueden utilizarse para el recubrimiento de liposomas.

Nanopartículas poliméricas pueden ser preparadas usando copolímeros bloque de PEG y de derivados PLGA como bloque hidrofóbico encontrándose en éstos casos que cuanto mayor es el contenido del bloque PEG menor es el aclaramiento y menor fijación al SER. Igualmente sobre nanopartículas de PLGA se pueden adsorber copolímeros de PEG-lisina obteniendose un largo tiempo de

Tabla 1.2. *Estructura de algunos polímeros utilizados para la preparación de liposomas estéricamente estabilizados.*



permanencia en el torrente circulatorio. Igual efecto se encuentra cuando se recubren nanopartículas de polialquicianoacrilato o dendrímeros modificados en su superficie con PEG.

Como consecuencia de la estabilización de los nanosistemas los parámetros farmacocinéticos del fármaco incorporado pueden modificarse profundamente; así el clorhidrato de doxorubicina administrado en solución salina presenta una semivida plasmática de 0,8 h y un aclaramiento de 14,4 ml/min-Kg mientras que administrado en forma de liposomas estabilizados (Doxil®) los parámetros

son de 54 h y 0,04 ml/min-Kg si bien debe tenerse en cuenta que el parámetro de semivida plasmática no es muy comparable puesto que los valores se han obtenido por métodos diferentes. Igual sucede en el caso del paclitaxel el cual presenta en su formulación con Cremophor EL (Taxol®) una semivida de 21,8 h y un aclaramiento de 3,9 ml/min-Kg mientras que en la formulación de complejo polimérico con poliglutamato (Xyotax®) los mismos parámetros son de 85 h y 0,09 ml/min-Kg.

Situación diferente se presenta en el caso del paclitaxel en forma de nanopartículas de albúmina (Abraxane®) ya que el tiempo de semivida es el mismo que el que presenta el principio actvo y el aclaramiento es incluso ligeramente superior (6,5 ml/min-Kg) debido a que las nanopartículas de albumina se disuelven rápidamente en el torrente circulatorio.

Otros polímeros con los que es posible que los nanosistemas presenten un largo tiempo de permanencia en plasma son: polivinilalcohol, polímeros derivados de polioxazolina, poliglicerol, poli N-vinilpirrolidona, poli [N (2-hidroxipropil) metacrilamida] y poliaminoácidos. En cualquier caso, bien sean los PEG o los polímeros que acabamos de mencionar, no siempre es deseable una estabilización estérica a nivel extravascular ya que el fármaco debe liberarse del nanosistema de forma eficiente para conseguir una adecuada respuesta terapéutica la cual se puede ver comprometida por la presencia de la cubierta estabilizadora. En el caso de fármacos, que facilmente penetran a través de la membrana celular, la presencia de la cubierta puede retrarsar su liberación y limitrar su biodisponibilidad terapéutica (Figura 1.7a). En el caso de fármacos que no pasan a través de la membrana su liberación a nivél extracelular no es una opción adecuada y se necesita que el nanosistema pase a través la membrana celular para que el fármaco alcance su diana terapéutica intracelular. En estos casos se puede favorecer la internalización del nanosistema por medio de ligandos de vectorización o interacción electrostática entre la carga positiva del nanosistema y la negativa de la membrana celular; en ambos casos la presencia de membranas estabilizadoras que rodean el sistema pueden no ser favorables para el proceso de internalización (Figura 1.7b y 1.7c).

Un nuevo tipo de polímeros que se han propuesto como estabilizadores de nanosistemas son lípidos del tipo 2 metacriloiloxietil fosforilcolina (MPC), comercializados con el nombre de Purebright® y que se presentan como estructuras biomiméticas de biomembranas. La ventaja que presentan éstos polímeros es que dan lugar a superficies altamente hidratadas (debido al grupo fosfolípido) que prestarian mejor protección que los PEG y derivados para fármacos de naturaleza proteica.

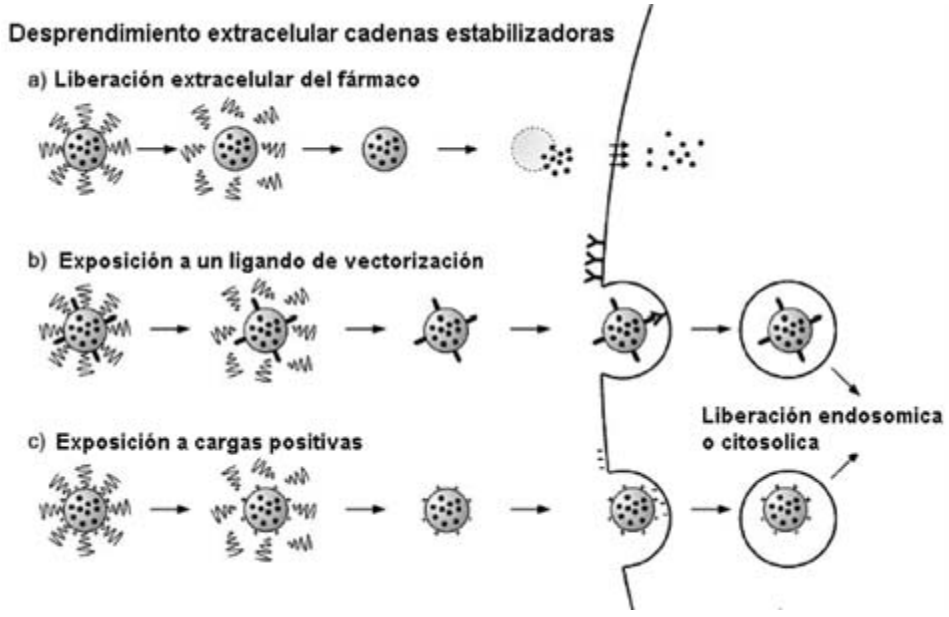


Figura 1.7. *Representación de diversas situaciones en las que interesa el desprendimiento de membranas estabilizadoras asociadas a nanosistemas.*

Desde hace algunos años se conoce que macromoléculas de elevado peso molecular (40 kD o más) y con un largo tiempo de permanencia en sangre así como vehículos farmacéuticos nanoparticulares son capaces de acumularse expontáneamente en diversos tejidos patológicos como tumores sólidos,. áreas infartadas o inflamadas a través del llamado efecto de permeabilidad y retención incrementados (EPR effect en la terminología inglesa). Este efecto, descrito inicialmente por Maeda, está basado en que el endotelio de los capilares que se encuentran en éstos tejidos o áreas presentan unas fenestras con diámetros de 200 a 600 nm lo que permite el paso de macromoléculas o sistemas nanoparticulares y su acumulación en el espacio intersticial; a ello se une una disminución de la circulación linfática, responsable del aclaramiento de macromoléculas en tejidos normales (Figura l.8).

Utilizando diferentes modelos de tumor la importancia del efecto EPR depende del tamaño y tipo de tumor. Los tumores pequeños muestran una mayor permeabilidad y, en consecuencia, una mayor acumulación lo cual resulta ventajoso para erradicar micrometástasis que son difíciles de tratar utilizando una terapia convencional. Por otra parte los tumores altamente vascularizados, como por ejemplo el sarcoma de Kaposi, presentan un mayor efecto de retención. Para

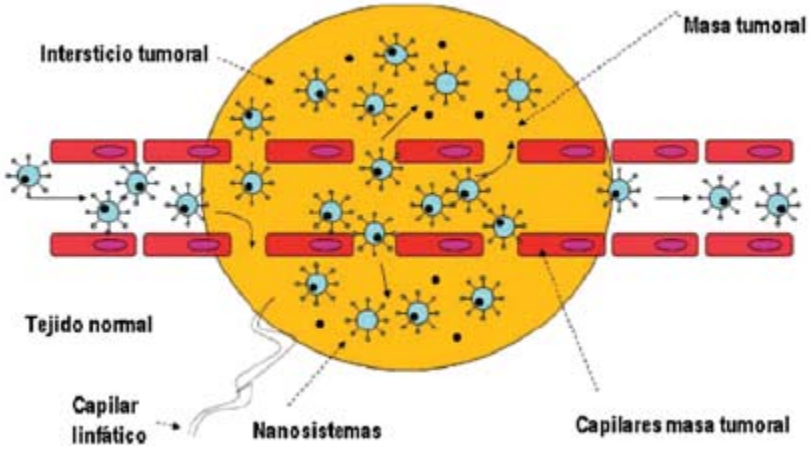


FIGURA 1.8. *Esquema del efecto incrementado de permeabilidad y retención (EPR effect).*

aquellos tumores poco vascularizados en el exterior y con un rápido crecimiento de la masa tumoral, la inyección intratumoral de los nanosistemas presentan ventajas frente a la administración i.v.

Las interacciones con los biofluidos y el acceso al fluido intersticial constituyen las barreras extracelulares pero muchos fármacos, particularmente los antineoplásicos, tienen sus dianas en el interior de las células tumorales por lo que la liberación intracelular se convierte en la clave para una eficiente respuesta terapéutica y además abre el camino para el desarrollo de la Terapia Génica ya que, como dice Vermer, «solo hay tres problemas en terapia génica: liberación, liberación y liberación».

Tal como se recoge en la Figura 1.9 las dianas terapéuticas celulares pueden situarse a nivel de la membrana, del citoplasma, mitocondria o núcleo celular pero, para que puedan interaccionar, es necesario que el fármaco o nanosistema en el que se encuentra pueda atravesar la membrana celular y alcanzar su diana específica intracelular. La escasa penetración intracelular o la degradación lisosomal son las causas de una baja biodisponibilidad biofásica y el fallo de prometedores agentes terapéuticos.

La internalización o paso de los nanosistemas a través de la membrana celular es un complejo proceso de interacciones entre éstos y ciertos componentes de la membrana a través de las cuales se modifican señales celulares con lo que la internalización puede tener lugar por medio de una endocitosis o pinocitosis inespecífica que es concentración y tiempo dependiente así como

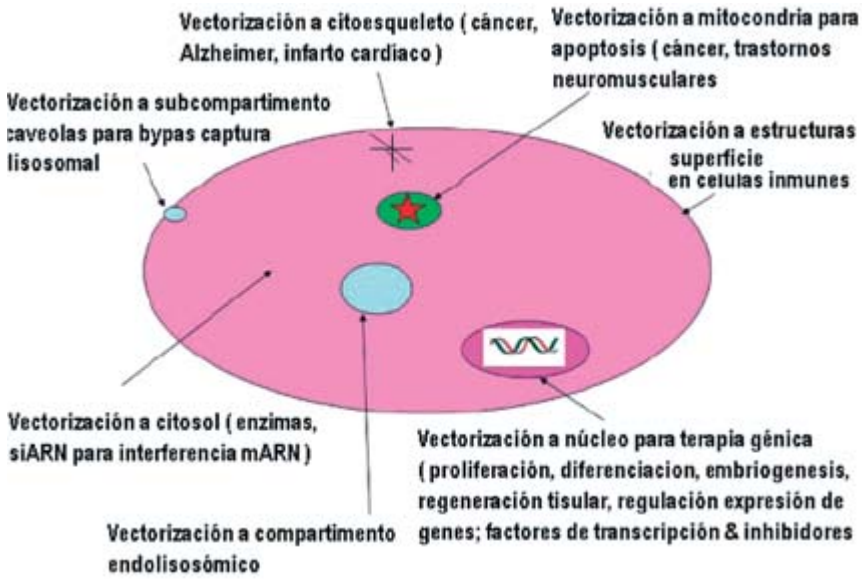


Figura 1.9. *Vectorización hacia dianas terapéuticas localizadas a nivel celular.*

dependiente del tipo de célula o bien endocitosis mediada por receptor. Como consecuencia del primer proceso se forman vesículas en la membrana celular que engloban macromoléculas o partículas presentes en el fluido extracelular. Este proceso puede tener lugar por los siguientes mecanismos: macropinocitosis o endocitosis en fase fluida, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolas y endocitosis por balsas lipídicas (lipid rafts).

La macropinocitosis o endocitosis en fase fluida tiene lugar por invaginación de la membrana celular mediante la cual se forman vesículas de 1 a 5 m, siendo un mecanismo altamente regulado y controlado por una cascada de señales en las que están presentes la familia Rho GTPasas que, a través de la actina, inducen protusiones que se colapsan y funden con la membrana celular. Este mecanismo de endocitosis presenta una serie de ventajas como son la importante cantidad de macromoléculas y partículas que pueden ser internalizadas y evitar su degradación lisosomal.

La endocitosis mediada por clatrina tiene lugar en los llamados hoyos recubiertos (coated pits) en los que se encuentra la proteína clatrina; en éstos hoyos se produce la invaginación de la membrana formandose endosomas, de 100 a 150 nm de diámetro, recubiertos por clatrina que contienen complejos ligan-

do-receptor. Este mecanismo de endocitosis puede incrementarse mediante el empleo de transferrina que puede reconocer específicamente ciertos receptores de la membrana celular.

La endocitosis mediada por caveolas tiene lugar en caveolas que son invaginaciones de la membrana celular, con un tamaño de 50-60 nm, recubiertas por una proteína especializada llamada caveolina. Las caveolas se localizan en zonas en las que se encuentran numerosos transportadores de membrana. Por el pequeño tamaño de las caveolas determina que sea poco relevante el papel que pueden representar en el proceso de endocitosis si bien en células epiteliales, por representar un 10-20% de la superficie celular, jugarian un papel importante en el paso de proteínas plasmáticas al espacio extravasal.

Para lípidos aniónicos o neutros, liposomas, nanopartículas lipídicas o nanopartículas hidrofóbicas existe otro mecanismo de endocitosis por medio de las llamadas balsas lipídicas (lipid rafts) que son microdominios de la membrana celular ricos en esfingolípidos y colesterol teniendo un tamaño de 40-60 nm de diámetro. Utilizando sistemas poliméricos la endocitosisis por balsas lipídicas puede potencializarse en función de la carga del sistema o la presencia de restos hidrofóbicos; la primera promueve una interacción electrostática entre el sistema y la membrana (con carga negativa) o bien una interacción con los lípidos que forman parte de ésta.

Aunque aun no están bien conocidos los mecanismos de internalización de los nanovehículos, se han propuesto los que se recogen en la Tabla 1.3.

Una especial atención se está prestando a la interacción entre las membranas celulares y ciertos lípidos, denominados facilitadores como DOPE (dioleilfofatidiletanolamina) y péptidos fusógenos como son los derivados del TAT (transactivator of transcription) del virus HIV, los conocidos como GALA o KALA, el péptido de 16 aminoácidos penetratina o la octaarginina. Aunque el mecanismo de penetración de éstos últimos no está bien aclarado es indudable que el conocimiento de éstos procesos constituye un aspecto clave a la hora de diseñar un nanosistema que requiere su internalización celular.

La presencia de lipidos facilitadores como el DOPE o de péptidos fusógenos asociados a nanosistemas determina que estos atraviesen la membrana celular por lo que las cadenas estabilizadoras deben desprenderse en el endosoma para que tenga lugar una adecuada liberación del principio activo al citosol (Figura 1.10).

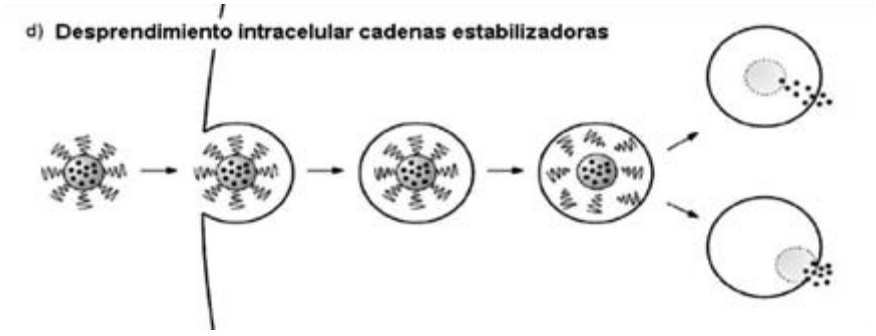


Figura 1.10. *Desprendimiento de las cadenas estabilizadoras en el interior del endosoma.*

Tabla 1.3. *Mecanismos propuestos para la internalización de nanovehículos farmacéuticos. PLGA: Copolímeros acido poliglicólico-poliláctico:; PACA Polialquicianoacrilatos; PEC: Complejos polielectrolitos; CPP: péptidos fusógenos; PAMAM: dendrímeros poliamidoamina.*

Nanosistema	*Posible mecanismo de internalización*
Nanoemulsión	Macropinocitosis o mediada por balsas lipídicas debido a su carácter hidrófobo
Nanopartículas PLGA	Dependiendo de las modificaciones químicas en la periferia del nanosistema: endocitosis en fase fluída o por hoyos de clatrina
Nanopartículas PACA	Endocitosis
Nanopartículas PEC	Endocitosis en fase fluída
Micelas	Endocitosis mediada por hoyos de clatrina
Dendrímeros:	Endocitosis en balsas lipídicas asociada a hoyos de clatrina para dendrímeros PAMAM o endocitosis mediada por receptor para aquéllos con ligandos HER2
Liposomas	Balsas lipídicas
Conjugados poliméricos	Macropinocitosis o endocitosis mediada por receptor para fármacos vectorizados
CPP	Diversos mecanismos de endocitosis más balsas lipídicas
Nanovehículos catiónicos (gen delivery)	Endocitosis en fase fluída
Nanovehículos lipídicos no funcionalizados (gen delivery)	Macropinocitosis o balsas lipídicas para sistemas no funcionalizados o endocitosis mediada por receptor (sistemas funcionalizados)

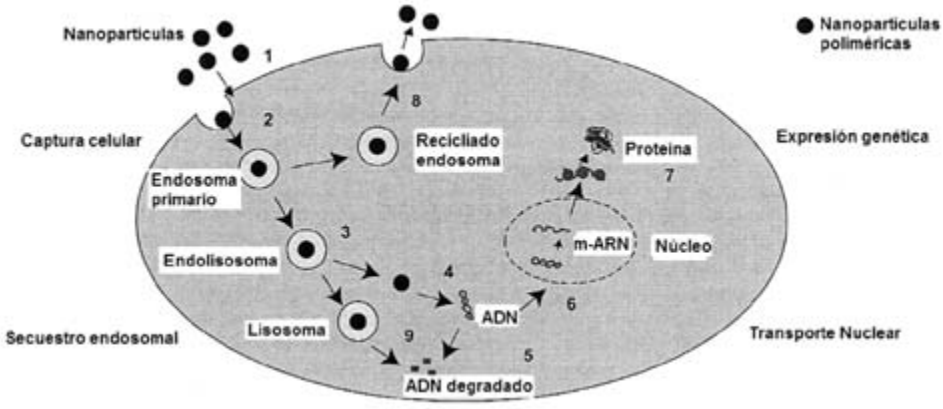


FIGURA 1.11. *Representación esquemática de las etapas que tienen lugar durante el tráfico intracelular de fármacos incluidos en nanosistemas.*

Una vez que se ha formado el endosoma primario en el interior de la célula (Figura 1.11) éste puede dirigirse hacia la membrana biológica y salir posteriormente al exterior de la célula, por un mecanismo de exocitosis, o bien englobarse con lisosomas, vesículas englobadas por una membrana, que contienen un elevado número de enzimas capaces de inactivar muchas moléculas formándose un endolisosoma. Estos enzimas actúan a pH ácido para lo cual la membrana lisosomal contiene una bomba de protones que permite que el lisosoma tenga un pH inferior a 5 por lo que se debe asegurar la protección de proteínas/plásmidos de la acción de las nucleasas lisosomales. La rotura del endolisosoma permite que el nanosistema libere el principio activo, parte del cual puede degradarse y parte puede alcanzar sus dianas, bien a nivel del citosol o del núcleo.

El transporte intracelular puede realizarse por un mecanismo endosomotrópico o lisosomotrópico En el primer caso, al producirse la acidificación del endosoma, tiene lugar un cambio en la conformación del polímero que provoca un aumento de la permeabilidad de la membrana endosómica. En el caso del transporte lisosomotrópico, aplicable a algunos polímeros o complejos polímero fármaco, el endosoma se une al lisosoma y por la acción de enzimas lisosomales (catepsina B) o por descenso del pH se produce la liberación del fármaco (Figura 1.12). El primer mecanismo de transporte es adecuado para fármacos susceptibles de degradación proteolítica, como proteínas o péptidos, mientras que el segundo es adecuado para el tráfico de fármacos estables a pH ácido o a sistemas enzimáticos.

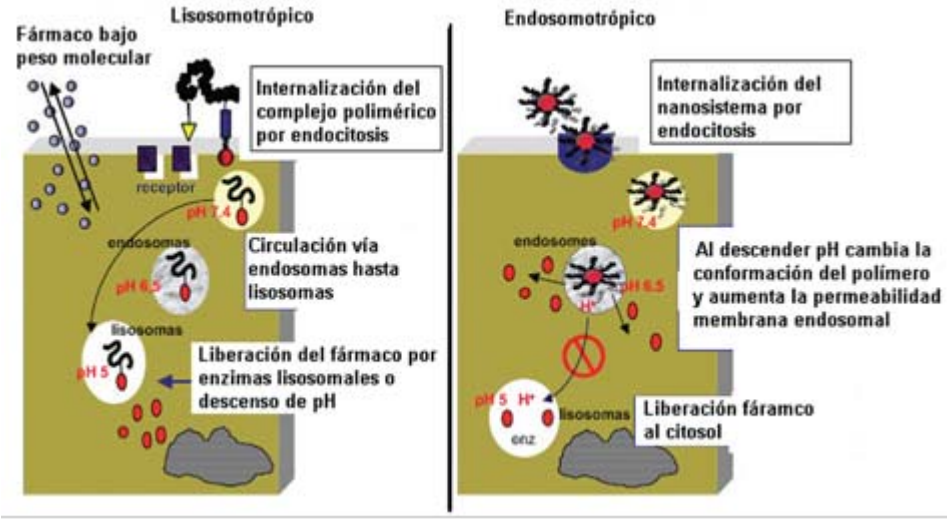


Figura 1.12. *Esquema de los diferentes mecanismos de tráfico intracelular de nanosistemas.*

A principios de los años noventa se comenzó a tener evidencia que la disfunción mitocondrial estaba implicada en un importante número de patologías como trastornos neurodegenerativos y neuromusculares, obesidad, diabetes y problemas de reperfusión isquémica lo que ha dado lugar al término Medicina Mitocondrial como nuevo campo de investigación biomédica que tendría como objetivo la identificación de nuevas dianas terapéuticas a nivel mitocondrial y el desarrollo de sistemas que permitiesen una liberación selectiva de fármacos en éstas dianas. En éste sentido se ha visto que el catión trifenilfosfonio (TPP) presenta propiedades mitocondriotrópicas y, por tanto, nanosistemas que lo contengan pueden acumular principios activos en éstas estructuras.

Torchilin y col. han diseñado liposomas constituidos por DOPC (1-2 dioleil sn glicero 3 fosfocolina), colesterol y estearíltrifenilfosfonio (83,5; 15; 1,5 mol%) así como un fosfolípido fluorescente (rodamina-fosfatidiletanolamina) como trazador.

Muchos de los recientes fármacos, fundamentalmente antineoplásicos, producen su acción sobre efectores genéticos de las células tumorales a través de una acción quelante o reticulación del ADN o bien interfiriendo su replicación, su transcripción o traslación por lo que la vectorización nuclear constituye el factor decisivo en éste tipo de fármacos. El núcleo está rodeado de una doble membrana, constituida por fosfolípidos similares a los de la membrana celular, y presenta poros acuosos 10 veces mayores que los de la membrana plasmáti-

ca los cuales permiten el paso de algunas macromoléculas (< 9 nm) solubles como ARN y algunas proteínas. Otras macromoléculas pueden pasar a través de la membrana nuclear por transporte activo por medio del complejo poro nuclear (CPN) constituido por proteínas denominadas porinas, que se caracterizan por la presencia de dominios constituidos por repeticiones múltiples de pequeñas secuencias de fenilalanina-glicina, que se disponen como una estructura anular en la membrana del núcleo, y cuya función está regulada por moléculas que se denominan señales de localización nuclear las cuales contienen aminoácidos catiónicos con restos que pueden ser fosforilados. Cuando estas moléculas, conocidas como importinas, son activadas se asocian con CPN y por medio de la actividad GTPasa (GTP: guanosina trifosfato) el complejo es introducido en el núcleo.

Desde el punto de vista tecnológico tiene interés la utilización, como promotor nuclear, de protamina de bajo peso molecular en base a su similitud con el péptido TAT 1 HIV; es por ello por lo que se realiza la complejación de la protamina con un plásmido ADN antes de proceder a su inclusión en un nanosistema.

Es generalmente aceptado, desde el punto de vista clínico, que es mucho menor la capacidad de transfección global de los vehículos no víricos frente a los víricos. Es por tanto necesario clarificar como y por qué los vehículos no víricos actuales son inferiores a los víricos así como cuantificar la influencia de cada una de las etapas del tráfico intracelular. Harashima y col, utilizando plásmido ADN marcado con rodamina o que codifican la proteina fluorescente, han podido establecer las diferencias existentes (Figura 1.13) cuando se incorporan a Lipofectamina PLUS (LFN) o a un adenovirus. El primer hecho destacado es la superior captación de las partículas de LFN (40%) frente al adenovirus (10%); en segundo lugar el escape de endosomas para ambos vehículos es solo ligeramente superior para el adenovirus y la captación nuclear es unas dos veces superior para el adenovirus. Por tanto, la diferencia en la capacidad de transfección, está ligada a los procesos de transcripción y traslación. El primero de ellos representa una diferencia de 16 veces menor para LFN y que ello se debe a una baja descondensación del plásmido a nivel nuclear mientras que el proceso de traslación se ve fuertemente afectado porque el mARN es una molécula cargada negativamente que interacciona vía electrostática con las partículas de LFN. En conclusión es necesaria una nueva estrategia para controlar la disposición intranuclear y minimizar la interacción citoplasmática entre m-ARN y vectores no víricos.

A la hora de diseñar un nanovehículo para la liberación intracelular de fármacos es importante considerar, desde el punto de vista biofarmacéutico, di-

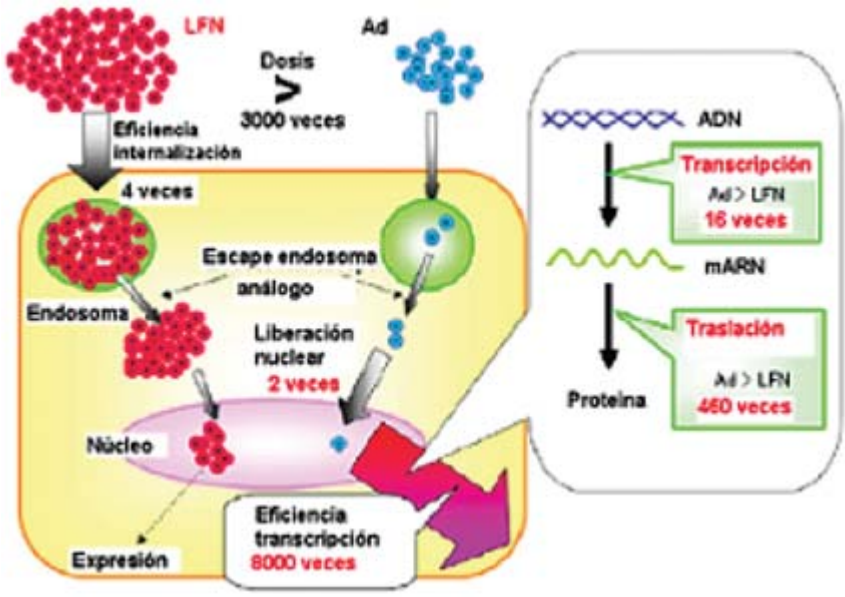


Figura 1.13. *Influencia de cada de una de las etapas del tráfico intracelular sobre la capacidad de transfección de vehículos víricos y no víricos.*

versos aspectos que van desde su liberación extracelular hasta la internalización del nanovehículo. Según Petrak éstos aspectos serían los siguientes:

- Eliminación de la circulación sanguinea: Es un aspecto esencial que el nanovehículo que contiene un principio activo no sea eliminado rápidamente de la circulación ya que ello da lugar a una disminución de la concentración del fármaco en su lugar de acción. Muchos fármacos se unen a componentes plasmáticos (principalmente seroalbúmina) o tisulares lo que condiciona su biodistribución y eliminación. El diseño de un nanovehículo se debe orientar hacia la minimización de las interacciones inespecíficas que se puedan producir con componentes del compartimento sistémico; para ello se utilizan macromoléculas inertes hidrosolubles o bien fijadas (covalentemente o por adsorción) a la superficie del nanovehículo.
- Liberación del principio activo en zonas no deseadas: Dependiendo de la cantidad del vector-fármaco administrado la liberación del principio activo fuera de su lugar de acción puede anular los beneficios que cabría esperar ya que podrían alcanzarse niveles tóxicos en ciertos tejidos o bien ser insuficiente la cantidad liberada a nivel de su lugar de acción.

- Liberación del fármaco en su lugar de acción: Si el fármaco contenido en el nanovehículo se libera lentamente en su lugar de acción puede que no se obtenga una concentración adecuada para poder desarrollar una respuesta terapéutica siendo irrelevante que la cantidad total de fármaco liberado en el lugar de acción sea suficiente por lo que se debe asegurar que la velocidad de liberación del fármaco sea suficiente para que éste se acumule en su lugar de acción.
- Muchos fármacos tienen su diana terapéutica a nivel intracelular y no poseen propiedades fisicoquímicas adecuadas para su paso a través de la membrana celular. En éstos casos el nanovehículo debe ser capaz de transportar el fármaco al interior de la célula y liberarlo en la diana terapéutica adecuada.

Los nanosistemas farmacéuticos se pueden administrar por todas las vías tanto locales como sistémicas permitiendo controlar la liberación y biodistribución del fármaco, mejorar su absorción a través de epitelios o células y protegerlo de su degradación. Sin embargo, hasta el momento actual, aun no existe un nanosistema farmacéutico universal adecuado para la liberación de cualquier fármaco si bien, para nanovehículos administrados por via i.v., se considera que deben tener un tamaño inferior a los 100 nm. poseer carga superficial negativa y no ser reconocidos por el SER.

Para los próximos años cabe esperar grandes avances en el conocimiento de la biología celular y molecular así como de los trastornos biológicos asociados a las diversas patologías que permitan identificar de forma precisa nuevas dianas terapéuticas y entrar de lleno en la era de la terapia génica.

Se precisa, en primer lugar, un mejor conocimiento de los procesos de internalización de fármacos y nanosistemas ya que estudios recientes, en los que se emplean técnicas como microscopía de fluorescencia y FACS (fluorescence activated cell sorter), revelan la existencia de diferentes mecanismos de internalización para un mismo nanovehículo pero es poco conocida la contribución relativa de cada uno; igualmente no están perfectamente clarificadas la influencia de las propiedades macromoleculares de los nanovectores, su tamaño y carga, presencia de agentes de internalización o de las propiedades fisicoquímicas del principio activo contenido en el nanosistema. El conocimiento de todos éstos aspectos contribuirá a un diseño mas racional de nanosistemas para diferentes tipos de células.

El tráfico de vesículas y organelas está regulado por motores moleculares y las proteínas Rab (proteínas de membrana que se unen a GPT) constituyendo la clave de los procesos de endocitosis, exocitosis, transporte vesicular y fusión

de los endosomas; un conocimiento mas profundo de ellos permitirá una mayor eficiencia del tráfico intracelular y una vectorización hacia determinadas estructuras intracelulares.

Los aspectos mas importantes del futuro desarrollo de nanovehículos son los referentes a su decoración con ligandos de internalización que permitan una mayor eficiencia en la vectorización del fármaco hacia su diana terapéutica; ello supone que una modificación en la biodistribución tisular tiene una importancia relativa ya que mejoras en su tráfico intracelular pueden tener implicaciones muy importantes sobre la eficacia del fármaco en su lugar de acción.

Los nanovehículos biomiméticos están siendo objeto de especial atención como posibles nuevas formas de dosificación por sus potenciales aplicaciones en la vectorización de fármacos y terapia génica. De todos ellos destacan los polímeros péptidomiméticos anfifílicos como por ejemplo ácido poliaspártico-PEG (desarrollados por NanoCarrier Co. Ltd, Japón) que están siendo empleados en el desarrollo de formulaciones micelares conteniendo citostáticos.

CONCLUSIÓN

Aunque la introducción de la nanotecnología ha supuesto un enorme avance en la consecución de la «bala mágica» propuesta por Ehrlich sin embargo aun quedan muchos problemas por resolver. Los siguientes avances provendrán de la introducción de nuevos materiales especialmente polímeros respondedores a estímulos a través de los cuales se puedan orientar hacia la diana terapéutica y liberar el fármaco de acuerdo con las finalidades terapéuticas deseadas.

Hoy día la nanotecnología farmacéutica, la última transformación profunda que ha sufrido la tecnología farmacéutica, aun siendo una ciencia típicamente farmacéutica por su contenido y su finalidad, sin embargo trabajan en ella investigadores de muy diversas áreas: bioquímicos, físicos, químicos de polímeros, etc. ya que, como dice Hermann Mark, *la confluencia de la ciencia de los polímeros con la medicina es una zona fronteriza donde convergen diferentes lenguajes y más allá de la cual solo puede avanzar un equipo interdisciplinar bien coordinado*. Por tanto ello no supone una merma o intromisión en nuestra actividad profesional porque para mí el galénico sigue teniendo como misión resolver un problema terapéutico utilizando los conocimientos que le proporcionan la biofarmacia y la tecnología farmacéutica y por ello se debe considerar al tecnólogo farmacéutico como el interlocutor y coordinador más caracterizado entre el clínico (que expone el problema terapéutico) y el equipo

interdisciplinar que trata de resolverlo. La validez de ésta actuación va a depender, por tanto, no solo de la formación galénica que posea sino también de las ciencias básicas que la sustentan, las cuales deben adaptarse a las rápidas exigencias que requieren actualmente los tratamientos farmacoterapéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Prokop, A. & Davidson, J.M. (2008) Nanovehicular intracelular delivery Systems. *J. Pharm. Sci*. 97 (9): 3518-359.

(2) Cancer Nanotechnology Plan: A strategic initiative to transform clinical oncology and basic research through the direct application of Nanotechnology: U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. Health National Cancer Institute (2004).

(3) European Technology Platform: Nanomedicine. Cordis.europe. eu/nanotechnology/nanomedicine.htm.

(4) European Medicines Agency (2006) Reflection paper on nanotechology-based medicinal products for human use.

(5) Domb, A.J., Tabata, Y., Ravi Kumar, M.N.V. & Farber, S. (2007) Nanoparticles for pharmaceutical applications. Ed.: American Scientific Publishers. Los Angeles.

(6) Couvreur P. & Vauthier, C. (2006) Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res*. 23: 1417-1450.

(7) Farokhzad, O.C. & Langer, R. (2006) Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv. Drug Del. Rev*. 58: 1456-1459.

(8) Boddapati, S.V., D´Souza, G.G.M., Erdogen, S., Torchlilin, V.P. & Weisseg, V. (2008) Organelle-Targeted Nanocarriers: Specific delivery of liposomal ceramide to mitochondria enhances its cytotoxicity in vitro and in vivo. *Nanoletters*. 8: 2559-2563.

(9) Kogure, K., Akita, H., Yamada, Y. & Harashima, H. (2008) Multifuncional envelope-type nano devide (MEND) as a non-viral gene delivery system. *Ad. Drug Deliv. Rev*. 60: 559-571.

(10) Petrak, K. (2005) Essential perspectives of drug targeting delivery Systems. *Drug Discov. Today.* 10: 1667-1673.

(11) Shyh-Dar, L. & Huang, L. (2008) Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*. 4: 496-504.

2. Nanosistemas a base de poliésteres

F. ROCHA FORMIGA, E. ANSORENA, A. ESTELLA-HERMOSO DE MENDOZA, E. IMBULUZQUETA, D. GONZÁLEZ, M. J. BLANCO PRIETO

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra

La utilización de nanopartículas es una importante área de la investigación en el campo de la liberación de fármacos, ya que estos sistemas permiten dirigir una amplia variedad de moléculas a los distintos tejidos liberándolos de manera sostenida en el tiempo. Además, el uso de nanopartículas minimiza la degradación del principio activo, incrementa su semivida en el interior del órgano a tratar y disminuye su toxicidad.

El término nanopartícula engloba las nanocápsulas y nanoesferas. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que el fármaco se localiza en el interior de la partícula, generalmente disuelto en un vehículo oleoso. Las nanoesferas, en cambio, son sistemas de tipo matricial donde el fármaco se suele encontrar encapsulado en el interior de la matriz (Figura 2.1).

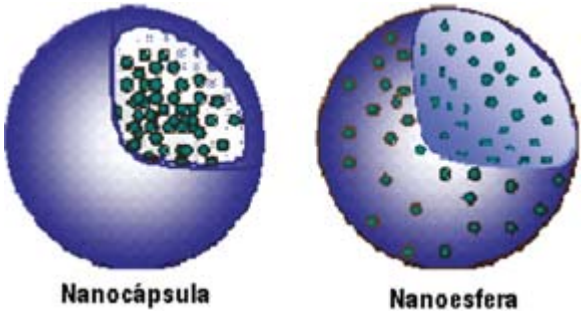


FIGURA 2.1. *Dibujo esquemático de una nanocápsula y una nanoesfera.*

Dentro de la nanotecnología, la búsqueda de polímeros para aplicaciones biomédicas ha experimentado un importante avance en las últimas tres décadas. Sobre todo, el estudio y desarrollo de polímeros sintéticos como componentes importantes de matrices utilizadas como vectores de moléculas terapéuticas. Dentro de los polímeros sintéticos destacan los poliésteres debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Los más utilizados son el ácido láctico (PLA) y los copolímeros formados por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico (PLGA), ya que han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral. Además, modificando el peso molecular, su grado de hidrofilia y la proporción de cada uno de los polímeros se puede controlar la velocidad de degradación de los mismos, el grado de encapsulación y el de liberación del fármaco o principio activo (1-3). Otros polímeros empleados para la obtención de nanopartículas son la poli-ε-caprolactona (4), el poli-β-hidroxibutirato (5) y el ácido β-l-málico (6). El polímero empleado para formular las nanopartículas afecta de manera importante a las propiedades y estructura de las partículas y condiciona sus posibles aplicaciones, así como la vía de administración (7).

Con el fin de obtener mejores eficacias de encapsulación los poliésteres han sido empleados combinados con otros polímeros hidrofílicos lo que permite modificar las propiedades de la superficie de las nanopartículas obtenidas (8, 9). En este sentido, también se han llevado a cabo combinaciones de los poliésteres con el polivinil alcohol (PVA) con el fin de estabilizar las nanopartículas obtenidas (10, 12).

Una gran variedad de fármacos pueden ser administrados utilizando vectores nanoparticulados. Así, las nanopartículas se pueden emplear para la liberación de sustancias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Además pueden ser formuladas para que su liberación sea dirigida a determinados tejidos u órganos, como por ejemplo al cerebro, pulmones, hígado, bazo, sistema linfático, etc. Por lo tanto, las ventajas de este tipo de nanopartículas formuladas con poliésteres son las de ofrecer una protección al principio activo en las condiciones biológicas y permitir una liberación sostenida en el tiempo evitando así administraciones repetidas, lo que conlleva una mayor comodidad para el paciente.

Las nanopartículas formuladas utilizando poliésteres tienen un gran número de aplicaciones tanto para fines diagnósticos como de tratamiento. En cuanto al diagnóstico, se han encapsulado agentes de contraste (*«quantum dots»*) para su utilización en imágenes de resonancia magnética o para imagen óptica. Dentro del diagnóstico por imagen, también se han empleado las nanopartículas en medicina nuclear y en la obtención de imágenes por ultrasonidos (12, 14).

Entre las distintas moléculas encapsuladas en nanopartículas formuladas con poliésteres se encuentran fármacos antitumorales, antígenos, péptidos y proteínas, genes, etc. para el tratamiento y prevención de distintas enfermedades (13, 26).

En el presente capítulo, se resumen y comentan las técnicas de preparación y de caracterización de nanopartículas formuladas a partir de poliésteres, así como sus aplicaciones más comunes.

POLÍMEROS

Los sistemas de transporte a base de materiales poliméricos en forma de nanopartículas requieren polímeros biocompatibles y biodegradables. Sin embargo, el riesgo potencial de infecciones e inmunogenicidad inducidas por sustancias poliméricas de origen animal o vegetal llevó a la necesidad de utilizar materiales sintéticos para reemplazar los polímeros naturales (27). Consecuentemente, una gran variedad de polímeros sintéticos ha sido desarrollada en los últimos quince años, teniendo en cuenta el requisito básico para materiales de aplicación biomédica: estos polímeros deben ser completamente degradados y eliminados del organismo. Los poliésteres son un grupo particularmente atractivo para el desarrollo de sistemas poliméricos nanoparticulados de liberación controlada por su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Además, algunos miembros de este grupo de polímeros presentan baja inmunogenicidad y pueden ser combinados con una amplia variedad de fármacos y otras moléculas de interés terapéutico (8, 28).

Ácido poli-láctico (PLA)/Ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA)

Entre los poliésteres utilizados en el desarrollo de nanopartículas destacan los poliésteres alifáticos, formados por una sucesión, bien de unidades monoméricas de ácido láctico o bien de dímeros láctico-co-glicólico. Estos biopolímeros han sido aprobados por la FDA para elaboración de sistemas de liberación de fármacos y otros usos biomédicos como la fabricación de suturas biodegradables (29, 30). El L-PLA y el PLGA son compuestos que corresponden respectivamente al homopolímero lineal del ácido poli-L-láctico y a copolímeros lineales del D,L ácido láctico y glicólico, los cuales se pueden encontrar en proporciones monoméricas variables. La copolimerización del PLGA puede ser llevada a cabo por dos rutas distintas de síntesis: 1) policondensación del ácido láctico y del ácido glicólico a temperatura superior

a 120 ºC, o por debajo de esta temperatura en presencia de catalizadores, obteniéndose así PLGA de bajo peso molecular (PM < 10.000 Da) (31); 2) polimerización vía apertura de los dímeros cíclicos de los dos respectivos ácidos, resultando en copolímeros de alta masa y mejores propiedades mecánicas (32). Por otro lado, el peso molecular de PLA/PLGA es un parámetro que influye en la homogeneidad de la muestra. En general, polímeros de elevado peso molecular dan lugar a sistemas nanoparticulados con un bajo índice de polidispersión (33).

Las nanopartículas biodegradables de PLGA han sido utilizadas como vectores para la liberación controlada de proteínas, péptidos, vacunas, genes, factores de crecimiento, etc. (8). El PLGA presenta ventajas y desventajas como biomaterial para la encapsulación de macromoléculas terapéuticas (34). La degradación del PLA/PLGA, que ocurre por hidrólisis no enzimática, puede dar lugar a una acumulación de sus monómeros ácidos, lo que resulta en la reducción del pH local y consecuente desnaturalización de proteínas encapsuladas (30, 35, 36). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de toxicidad de sus productos de degradación y su modulable velocidad de degradación hacen del PLGA el poliéster más utilizado en formulaciones nanoparticuladas de aplicación terapéutica (37-41). Otra importante ventaja del PLGA sobre el L-PLA, es que al presentar una velocidad de degradación más rápida, la probabilidad de que ocurran reacciones adversas debido a fragmentos cristalinos liberados por estos últimos, es menor (42).

Poli-ε-caprolactona (PCL)

La poli-ε-caprolactona (PCL) ha sido utilizada en la última década para encapsular principios activos de diferentes grupos farmacológicas. Además de su adecuada biocompatibilidad y baja imunogenicidad, la PCL presenta algunas características particulares que justifican su uso como biomaterial en el campo de la liberación controlada de fármacos. Su biodegradación más lenta, en comparación con el PLGA, aumenta la semivida biológica de las moléculas encapsuladas, lo que permite su uso en formulaciones nanoparticuladas para la administración de principios activos para los cuales es necesaria una liberación mantenida durante periodos de tiempo prolongados. Por otro lado, la PCL genera durante su degradación una cantidad menor de productos ácidos comparada con el PLGA (4). Nanopartículas preparadas con PCL han mejorado la biodisponibilidad ocular de cartelol (43), indometacina (44) y aceclofenaco (45).

Poli (β-hidroxibutirato) (PHB)

El poli (β-hidroxibutirato) (PHB) es otro poliéster biodegradable, lineal, estable a temperatura ambiente y semicristalino, con una velocidad de degradación más lenta que otros poliésteres empleados en formulaciones de nanopartículas. Aunque no sea muy utilizado en tecnología farmacéutica, el PHB puede facilitar la liberación de fármacos de bajo peso molecular debido a la penetración de agua y formación de poros en la matriz polimérica nanoparticulada (5). Mezclas de PHB y L-PLA pueden presentar ventajas frente al L-PLA puro y se utilizan para optimizar la liberación controlada de moléculas activas a partir de formulaciones nanoparticuladas (46). Una combinación más común es la del poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), un polímero biodegradable que ha sido utilizado en la obtención de nanocápsulas de L-asparraginasa y otras enzimas utilizadas en la terapia del cáncer. El PHBV de bajo peso molecular favoreció el aumento de la eficacia de encapsulación y de la actividad enzimática de dichas enzimas (47).

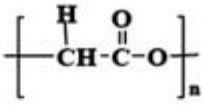
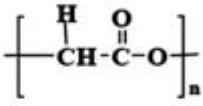
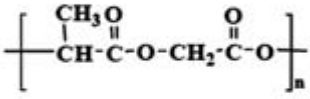
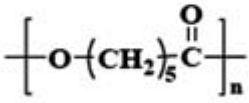
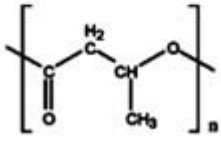
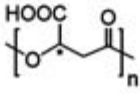
Ácido poli (β,L-málico) (PMLA)

El ácido poli (β,L-málico) (PMLA) fue sintetizado por vía química antes de que se conociera su existencia natural. La mayor parte de la investigación sobre este poliéster funcionalizado con grupos carboxílicos se ha centrado en la síntesis química para aplicaciones biomédicas. Nanopartículas de PMLA han sido preparadas con el objetivo de encapsular proteínas de distintos puntos isoeléctricos. La quimiotripsina, por ejemplo, ha sido encapsulada en nanopartículas de PMLA manteniéndose su actividad enzimática durante períodos de tiempo prolongados comparados con la enzima libre (6).

La Tabla 2.1 resume los principales poliésteres utilizados en la fabricación de sistemas nanoparticulados para la liberación controlada de fármacos y moléculas bioactivas.

Se han empleado distintas combinaciones de polímeros principalmente con dos objetivos: modificar las propiedades de superficie de las nanopartículas y disminuir la degradación de las moléculas encapsuladas (8, 48). Mediante la modificación del PLGA se puede optimizar la estabilidad del fármaco encapsulado, su perfil de liberación y/o dirigir las nanopartículas a una diana específica. En este contexto, los poliésteres han sido combinados con polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG) y el polióxido de etileno (PEO) (9, 49). La

Tabla 2.1. *Poliésteres utilizados como matriz polimérica para encapsular distintas moléculas en nanopartículas. PLA: ácido poli-láctico; PGA: ácido poli-glicólico; PLGA: ácido poli-láctico-co-glicólico; PCL: poli-ε-caprolactona; PHB: poli (β-hidroxibutirato); PHBV: poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato; PMLA: ácido poli (B,L-málico).*

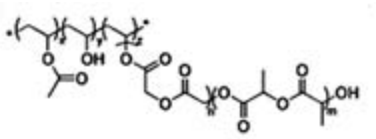
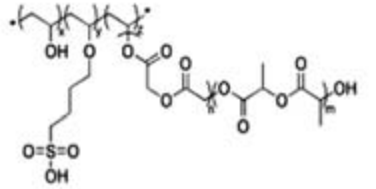
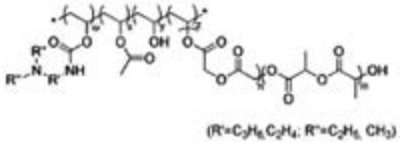
Poliéster	*Estructura química*
PGA	
PLGA	
PCL	
PHB	
PHB	
PMLA	

modificación superficial de la partícula con PEG, proceso comúnmente denominado «pegilación», conlleva importantes cambios en las propiedades físico-químicas de las nanopartículas, como la neutralización de su potencial zeta y la reducción de la hidrofobicidad superficial (48, 50, 51). Senthilkumar y col. (49) no observaron cambios importantes en los tamaños de nanopartículas de PLGA pegiladas con PEG de distintos pesos moleculares, en comparación con nanopartículas de PLGA no pegiladas. Las cadenas de PEG forman una barrera estérica en la superficie de las nanopartículas, impidiendo la opsonización y el re-

conocimiento por parte de los macrófagos, que resultaría en la eliminación de las nanopartículas por el sistema retículo endotelial en pocos segundos tras su administración intravenosa (4, 48, 50). Por lo tanto, la pegilación incrementa la semivida biológica de las moléculas encapsuladas en las nanopartículas. Así se ha observado que nanopartículas pegiladas de docetaxel posibilitan una mayor acumulación del antineoplásico en tumores sólidos en ratón (49). Danhier y col. (52) observaron un mayor efecto inhibitorio inducido por el paclitaxel encapsulado en nanopartículas de PLGA pegiladas sobre el crecimiento tumoral en hígado de ratón, comparado con la administración de Taxol®. Nanopartículas fabricadas con copolímeros hidrofílicos presentaron mayor tiempo de permanencia en sangre y una reducida acumulación en el hígado de ratón (53). Además, la capa de PEG mejoró la estabilidad de nanopartículas de PLA en el medio gastrointestinal, facilitando el transporte de la toxina tetánica a través de las mucosas intestinal y nasal (54).

Como se ha mencionado anteriormente, la conjugación del PLGA con otros polímeros también ha sido utilizada como estrategia para estabilizar macromoléculas terapéuticas en nanopartículas. En este sentido, los poliésteres de arquitectura molecular ramificada (PAMR) basados en la conjugación del PLGA con el alcohol polivinílico (PVA) han sido desarrollados y clasificados en tres generaciones, de acuerdo con los distintos grupos moleculares incorporados al PVA (Tabla 2.2). Los PAMR se han empleado en la fabricación de vectores nanoestructurados con el objetivo de optimizar las propiedades del PLGA y su capacidad de modular la liberación y la estabilidad de macromoléculas encapsuladas. El carácter anfifílico y la hidrofilicidad de esta clase de polímeros son importantes ventajas para la encapsulación de macromoléculas, como péptidos o DNA (55). La cadena principal del PVA puede ser modificada por la asociación de grupos sulfobutilo o amino, lo que permite la obtención de PAMR con cargas positivas o negativas. Así los grupos amino producen poliésteres ramificados cargados positivamente, que facilita la encapsulación del DNA en nanopartículas en el campo de la vacunación y terapia génica. Las interacciones electrostáticas con grupos amino terciarios probablemente estabilizan el DNA en el interior de la matriz polimérica, lo que permite la encapsulación de dicha macromolécula en nanopartículas del PAMR (55, 57). Oster y col. (58) investigaron el grado de sustitución por grupos amino en la estructura polimérica y su relación con las propiedades de las nanopartículas de DNA. Dichas partículas presentaron tamaños entre 150 y 350 nm (grado de sustitución por grupos amino de 4 % y 11 % respectivamente), mientras que las nanopartículas preparadas con PLGA empleando las mismas condiciones presentaron un tamaño de 200 nm o superior. Jung y col. (59) observaron un aumento significativo del contenido de la toxina tetánica encapsulada en

Tabla 2.2. *Distintas generaciones de poliésteres de arquitectura molecular ramificada*

Poliéster ramificado	*Estructura química*	*Ventajas en sistemas nanoparticulados*
PVA-g-PLGA (primera generación)		Adecuado para encapsular proteínas para la administración parenteral (8). Mayor eficiencia de encapsulación de proteínas comparada con el PLGA.
Sulfobutil-PVA-g-PLGA (segunda generación)		Sistema polimérico para la obtención de un adyuvante nanoparticulado(59).
Amino-PVA-g-PLGA (tercera generación)		Variabilidad en la velocidad de biodegradación mediante modificación del polímero. Alta eficiencia de encapsulación de DNA (55) e insulina (64) por mecanismos electrostáticos.

nanopartículas preparadas con un PAMR de segunda generación (6 % p/p), comparado con su contenido (0,5 % p/p) en nanopartículas de PLGA. La mayor o menor elongación de las cadenas laterales del PLGA también resulta en modificaciones en la flexibilidad del nuevo sistema polimérico, una característica que puede ser adaptada a las necesidades de múltiples fármacos y/o moléculas bioactivas. Además, la velocidad de biodegradación puede ser manipulada mediante modificación de la arquitectura molecular del polímero, lo que permite obtener poliésteres ramificados con un rango de semivida de varias horas a varias semanas (55). Sin embargo, a pesar de que los PAMR son poliésteres interesantes para la formulación de nanopartículas, es necesaria una mayor investigación sobre sus mecanismos de biodegradación y su perfil toxicológico (8).

La PCL también ha sido utilizada en el diseño de polímeros anfifílicos hiper ramificados y funcionalizados para la vectorización de antineoplásicos me-

diante nanopartículas (60). Además, combinaciones de PCL con otros poliésteres y con otros tipos de polímeros han sido empleadas para encapsular nimlodipino (41), atovacuona (61), tamoxifeno (62), ciclosporina A (63) y otras moléculas terapéuticas en nanopartículas.

MÉTODOS DE PREPARACIÓN

Durante las últimas décadas, se han desarrollado varias técnicas para la formulación de nanopartículas. Su fabricación ha evolucionado principalmente en tres aspectos: 1) búsqueda de componentes menos tóxicos; 2) simplificación del proceso para fabricación a nivel industrial; y 3) optimización de las técnicas en cuanto a rendimiento y eficacia de encapsulación (65).

Los métodos para la preparación de nanopartículas son distintos dependiendo de si partimos de polímeros preformados o de sus monómeros (66).

En lo referente a estos últimos, se han propuesto diferentes métodos para preparar nanopartículas de compuestos naturales. Entre estos métodos encontramos aquellos que implican el uso de calor o sonicación, elevados volúmenes de disolventes orgánicos o aceites, y agentes químicos reticulantes que presentan toxicidad. Además, la incertidumbre de la fuente y pureza de las macromoléculas y el potencial antigénico que presentan restringen el uso de este tipo de nanopartículas (65). Inconvenientes similares se han descrito para nanopartículas poliméricas preparadas por polimerización de monómeros. Además de no ser biodegradables, tanto las nanopartículas formadas a partir de esos monómeros como sus residuos monoméricos u oligoméricos pueden resultar tóxicos Por otro lado, si se emplea radiación para inducir la polimerización, pueden tener lugar reacciones de entrecruzamiento entre el polímero y el principio activo o degradación de los componentes de la nanoparticula (7), disminuyendo así la actividad del sistema.

Los principales métodos para preparar nanopartículas a partir de poliésteres son: evaporación del disolvente, nanoprecipitación, «*salting out*», difusión del disolvente y fluidos supercríticos.

Evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión

Este método se basa en el procedimiento patentado por Vanderhoff y col. (67) para la preparación de pseudolátex o látex artificial. Es el método más uti-

lizado para formar nanopartículas poliméricas a partir de poliésteres y se basa en la emulsificación de una solución orgánica que contiene el polímero en una solución acuosa de un agente tensioactivo o estabilizante seguida de la evaporación del disolvente orgánico. El polímero se disuelve en un disolvente apropiado (p. ej. acetato de etilo, cloroformo, diclorometano). La fase interna de la emulsión se añade sobre la fase externa acuosa, en la que se disuelve un agente tensioactivo que proporciona estabilidad a la emulsión. La emulsificación tiene lugar mediante agitación por cizalladura para reducir el tamaño de la gotícula de la emulsión (directamente relacionada con el tamaño final de las nanopartículas (68)). A este proceso de emulsificación le sigue la evaporación del disolvente orgánico, que provoca la precipitación del polímero y la formación de las nanopartículas (8, 68, 69). Como paso final, la suspensión de las nanopartículas formadas se somete a una serie de lavados con agua purificada para eliminar el exceso de agente estabilizante. Todo el proceso aparece esquematizado en la Figura. 2.2.

La mayoría de disolventes empleados en esta técnica son organoclorados, principalmente diclorometano y cloroformo, por su inmiscibilidad en agua, fácil emulsificación, propiedades de solubilización y bajo punto de ebullición. Sin embargo, la desventaja que presentan estos disolventes es su toxicidad (clase 2 en las guías ICH para disolventes residuales (70)), por lo que siempre se debe verificar el contenido residual de dichos disolventes en la formulación final.

El PVA ha sido el agente estabilizante más empleado a la hora de preparar nanopartículas biodegradables a partir de poliésteres. Además, es uno de los pocos que previene la agregación de partículas durante los pasos post-preparativos, como pueden ser la purificación y el liofilizado. Se ha observado que el incremento en la concentración del agente estabilizante produce una disminución del tamaño de las nanopartículas para concentraciones de PVA inferiores al 10%, punto a partir del cual el tamaño empieza a aumentar (71).

Los polímeros más empleados en esta técnica son el PLA (72, 73), el PLGA (8, 74), la PCL (4, 75) y el PHB (76). La concentración y peso molecular del polímero a utilizar también afectarán a la formación de nanopartículas. En el caso del PLGA, el más empleado de los poliésteres, el peso molecular presenta un efecto inverso sobre el tamaño y la eficiencia de encapsulación. Se pueden preparar nanopartículas de aproximadamente 100 nm con polímeros de bajo peso molecular, sin embargo, se reduce de la eficiencia de encapsulación del fármaco (65). Por otra parte, un aumento de la concentración de polímero aumenta la eficiencia de encapsulación pero también el tamaño de las nanopartículas. El rango óptimo de concentración de polímero oscila entre un 2% y un 5% (p/v) (77).

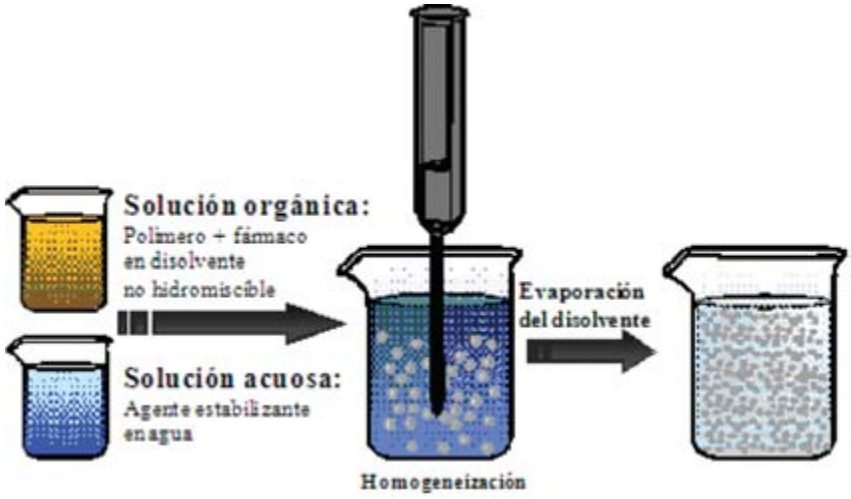


FIGURA 2.2. *Representación esquemática del método de evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión.*

A pesar de que la ultrasonicación ha sido ampliamente empleada como procedimiento homogeneizador, presenta una serie de inconvenientes tales como posible contaminación de la formulación con titanio, elevado índice de polidispersión del tamaño de las nanopartículas, inducción de reacciones químicas de degradación y dificultad de elaboración a gran escala (65).

Las emulsiones simples, orgánico en acuoso (O/A) o acuoso en orgánico (A/O) y las emulsiones múltiples (A/O/A) pueden emplearse para incluir principios activos de distintas características. La emulsión O/A suele emplearse para la encapsulación de principios activos hidrófobos o agentes de contraste (14), mientras que la emulsión múltiple A/O/A es más usada para la encapsulación de principios activos hidrófilos. La formación de la emulsión es un aspecto fundamental del método, ya que puede considerarse que el tamaño de la gotícula que se forma en la emulsión está directamente relacionado con el tamaño final de la partícula (68).

Nanoprecipitación

Esta técnica también recibe el nombre de «sustitución del disolvente» (78). En este proceso, el polímero, el fármaco, y, de manera opcional, un estabilizante lipofílico se disuelven en un disolvente polar miscible en agua, como acetona o etanol (8). Esta solución se adiciona sobre un no-solvente bajo agitación magnética, entendién-

Figura 2.3. *Representación esquemática del método de nanoprecipitación.*

dose por «no-solvente» aquel disolvente que es miscible con el disolvente del polímero y en el cual el polímero es insoluble. A medida que se adiciona el no-solvente se provoca la insolubilización del polímero, el cual precipita. Generalmente, el no-solvente está constituido por una solución acuosa que contiene un agente estabilizante, por ejemplo, PVA (79) o poloxámero 188 (75). Las nanopartículas se forman instantáneamente por una rápida difusión del disolvente al medio acuoso, que se elimina posteriormente de la suspensión sometiéndola a presión reducida (Figura 2.3).

El mecanismo de formación de las partículas por este método se explica por las turbulencias interfaciales que se generan durante la sustitución del disolvente. Aquí, se observa una difusión violenta debida a la miscibilidad de los disolventes. Las gotículas de disolvente, de tamaño nanométrico, son eliminadas de la interfase (65, 80). Estas gotículas se estabilizan rápidamente por el agente tensioactivo, hasta que se da la completa difusión del disolvente y, por tanto, la precipitación del polímero. La utilidad de esta técnica está limitada a disolventes miscibles en agua, en los cuales el ritmo de difusión es lo suficientemente rápido como para producir la emulsificación espontánea. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es la dificultad de elección del sistema fármaco/polímero/disolvente/no-solvente en el cual se formen las nanopartículas. Además, esta técnica únicamente es útil para principios activos solubles en este tipo de disolventes como pueden ser la indometacina, ciclosporina A o 5-fluorouracilo (63, 80).

El tamaño de las partículas y el rendimiento de fabricación se ven afectados por la concentración del polímero. Generalmente se usan concentraciones entre 1% y 10% (p/v) de polímero. Este comportamiento se atribuye al incremento en la viscosidad de la fase orgánica. Niwa y col. (81) mostraron que el rendimiento de fabricación de las nanopartículas de PLGA aumentaba con el incremento en la concentración del agente estabilizante. Distintos autores obtuvieron resultados similares para nanoesferas de PCL, usando poloxámero 188 como agente estabilizante (82, 83). Recientemente, se ha demostrado que el diá-

metro medio de las nanopartículas de PLGA aumenta al incrementar la concentración de PVA (84). Este efecto se relaciona con las elevadas concentraciones de PVA (2-6% p/v), que aumentan la viscosidad del medio acuoso, disminuyendo así la velocidad de difusión del disolvente. El peso molecular del PVA también influye de manera decisiva en el tamaño de partícula, rendimiento de la formulación y redispersión de las partículas liofilizadas (77). Así, el PVA de alto peso molecular es útil para aumentar el rendimiento del proceso, así como para obtener una homogeneidad en tamaño y una mejor redispersión de las partículas liofilizadas, a diferencia del PVA de bajo peso molecular (12).

El método de nanoprecipitación permite la preparación de nanocápsulas cuando se añade un pequeño volumen de un aceite no tóxico a la fase orgánica (85). En este caso, hay que tener en cuenta dos aspectos importantes en la selección del aceite: i) no debe degradar el polímero, y ii) debe ser un buen solvente para el fármaco de manera que no favorezca una rápida liberación y reduzca la cristalización espontánea del fármaco durante su preparación. Teniendo en cuenta la naturaleza lipídica de las cavidades centrales de las nanocápsulas, se han descrito elevadas eficacias de encapsulación de fármacos lipófilos como octilmetoxicinamato, indometacina o diclofenaco (83, 86-88).

Con respecto al método de evaporación del disolvente, la nanoprecipitación presenta la ventaja de que, además de ser un método apropiado para encapsular principios activos hidrofóbicos, se consume menor energía durante el proceso de formación de las nanopartículas, ya que únicamente requiere una agitación leve en lugar de sonicación o microfluidización (77). Por otro lado, presenta una serie de desventajas como son: 1) el requerimiento de elevadas cantidades de agua para la formación de las nanopartículas; 2) tiempos prolongados de agitación; 3) el tamaño es sensible a la concentración de polímero si no se utiliza una elevada agitación por cizalladura para la reducción del mismo; y 4) baja eficacia de encapsulación de principios activos hidrófilos, por la elevada tendencia a la difusión del activo a la fase acuosa (77). Sin embargo, recientemente este método ha sido modificado para lograr encapsular principios activos hidrófilos, combinando la técnica de evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión doble con la técnica de la difusión del disolvente (89, 90).

«Salting out»

Este método se basa en la separación de un disolvente hidromiscible de una solución acuosa rica en electrolitos (91). La acetona suele ser el disolvente elegido debido a sus características de solubilización y su buena separación de so-

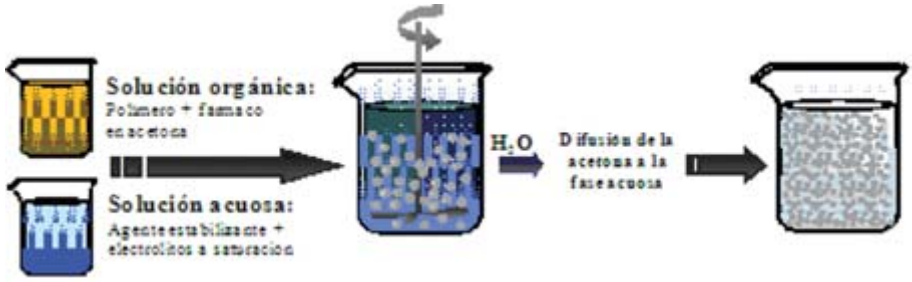


FIGURA 2.4. *Representación esquemática del método «salting out».*

luciones acuosas con los electrólitos (o agentes «*salting out*») (92, 93). El polímero y el fármaco se disuelven en acetona, y esta solución se emulsifica bajo una fuerte agitación mecánica en un gel acuoso que contiene los electrolitos y un estabilizante (94). Esta emulsión O/A se diluye con un volumen suficiente de agua o de soluciones acuosas para potenciar la difusión de la acetona hacia la fase acuosa, induciendo así la formación de nanoesferas. El disolvente y los electrolitos se eliminan por filtración de flujo transversal. Los pasos para este procedimiento se describen en la Figura. 2.4.

El mecanismo de formación de las nanopartículas se asemeja en cierto modo a la nanoprecipitación. Así, la difusión de la acetona desde las gotículas durante el paso de dilución puede generar turbulencias en la interfase y la precipitación del polímero en forma de nanopartículas.

La elección correcta del electrolito es muy importante porque juega un importante papel en la eficacia de encapsulación. Ejemplos de electrolitos para la acetona empleados en este método son el cloruro de magnesio, cloruro sódico, cloruro cálcico y acetato magnésico; y un no-electrolito, la sacarosa. Así, por ejemplo, la eficacia de encapsulación de la savoxepina puede aumentarse empleando una sal básica como acetato magnésico en lugar de sales neutras o ácidas (93).

Con respecto al agente estabilizante, se han empleado el PVA (93, 95), la polivinil pirrolidona (PVP) (95) y la hidroxietilcelulosa (77, 95), observándose que un incremento en la concentración de agente estabilizante en la fase externa de la emulsión produce una disminución notable del tamaño de partícula, mientras que un incremento en la velocidad de agitación y concentración de polímero implica una disminución menor del tamaño (93).

Una de las principales ventajas de esta técnica es la posibilidad de incorporación de altas cantidades tanto de polímero como de fármaco, ya que el tamaño medio de las nanopartículas no es tan dependiente de la concentración de

polímero empleada, a diferencia de lo que ocurre en otros métodos. Así, la concentración óptima de polímero puede alcanzar hasta 20% (96). Otras ventajas son los excelentes rendimientos del proceso, la facilidad de adaptación de la fabricación a gran escala y la posibilidad de encapsular proteínas y demás principios activos termolábiles, debido a que no se utilizan elevadas temperaturas. En contrapartida, esta técnica está exclusivamente limitada a fármacos lipofílicos, electrolitos que permitan la separación de las fases evitando la precipitación y agentes estabilizantes compatibles con soluciones acuosas saturadas y que no coacerven en presencia del disolvente, además de una serie de intensos lavados para eliminar los electrolitos (80, 92).

Difusión del disolvente

Este método podría considerarse una modificación de la técnica «salting out», evitando el uso de sales y, por tanto, una serie de intensos pasos de purificación. Consiste en el uso de un disolvente parcialmente miscible en agua, que previamente se satura con agua para asegurar el equilibrio termodinámico entre ambos líquidos (77, 80). El polímero se disuelve en el disolvente saturado con agua, y esta fase orgánica se emulsifica, bajo agitación vigorosa, en una solución acuosa que contiene un agente estabilizante. La posterior adición de agua al sistema provoca la difusión del disolvente a la fase externa, formándose así las nanopartículas. Dependiendo del punto de ebullición del disolvente, éste puede eliminarse por destilación o por filtración de flujo transversal. El procedimiento está ilustrado en la Figura 2.5, y al igual que en la mayoría de las técnicas anteriores, este método es eficaz para la encapsulación de fármacos lipófilos.

El mecanismo de formación de las nanopartículas ha sido descrito bajo diferentes condiciones de preparación. Se ha comprobado que cada gotícula de la

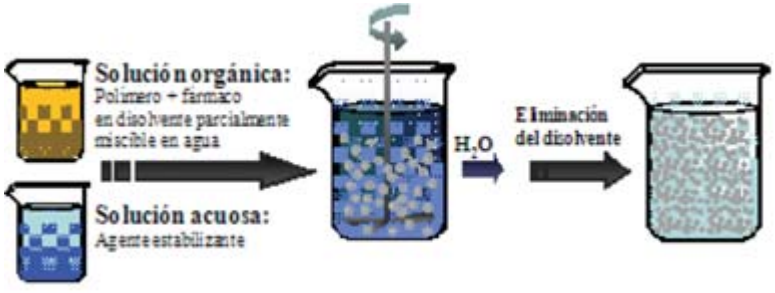


FIGURA 2.5. *Representación esquemática del método de difusión del disolvente.*

emulsión produce varias nanopartículas y que éstas se forman por distintos fenómenos que ocurren en la interfase durante la difusión del disolvente. Sin embargo, a diferencia de otros métodos, la formación de las nanopartículas no puede ser completamente explicada por las turbulencias producidas en la interfase. Por lo tanto, se ha sugerido que las nanopartículas se forman por la inestabilidad fisicoquímica que produce el transporte del disolvente, de manera similar al mecanismo utilizado para explicar los procesos de emulsificación espontánea (80). La difusión del disolvente desde los gotículas transporta consigo moléculas a la fase acuosa, formando regiones localizadas sobresaturadas, en las cuales se originan nuevos glóbulos o agregados de polímero (no totalmente desolvatados). La estabilización de estas «nanopartículas embrionarias» por la presencia de un agente estabilizante es crucial para evitar fenómenos de coalescencia y formación de aglomerados.

Los disolventes más utilizados para la formación de nanopartículas mediante esta técnica son el alcohol bencílico, el carbonato de propileno y el acetato de etilo. Con respecto al agente estabilizante, los más empleados son el dodecil sulfato sódico (SDS), el PVA y el bromuro de didodecilmetilamonio (DMAB) (77).

Fluídos supercríticos

Alguna de las técnicas explicadas previamente son complejas, y los productos obtenidos poseen un contenido residual de disolvente orgánico, una baja encapsulación, presentan degradación del principio activo o desnaturalización, una liberación de fármaco inadecuada, o propiedades físicas y morfológicas inapropiadas (97). Las técnicas basadas en fluidos supercríticos pueden ser una herramienta interesante para preparar productos nanoparticulados. En aplicaciones farmacéuticas, el fluido supercrítico más empleado es el CO_2, por su baja toxicidad. Moléculas como indometacina o ketoprofeno se han procesado recientemente en nanopartículas de poliésteres utilizando esta técnica (98-100).

En esta técnica, el fármaco y el polímero se solubilizan en un fluído supercrítico, y la solución se expande a través de una boquilla (Figura 2.6). El fluído supercrítico se evapora durante el proceso de generación del aerosol, y las partículas de soluto finalmente precipitan y se recogen. Las principales ventajas que ofrece esta técnica son la reducción en el uso de disolventes orgánicos y la posibilidad de formar las nanopartículas sin recurrir a elevadas temperaturas. Sin embargo, este novedoso proceso requiere una elevada inversión inicial para la obtención del equipamiento necesario y operar a elevadas presiones usando sistemas de alta presión. Además, los fluídos supercríticos comprimidos demandan una se-

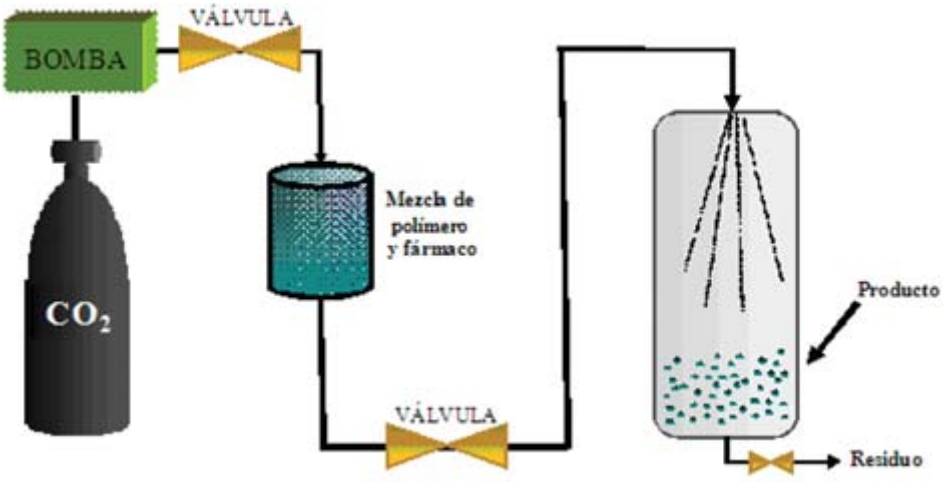


FIGURA 2.6. *Representación esquemática del método de fluídos supercríticos.*

rie de medidas de reciclado para reducir costes energéticos. Por último, es muy complicado disolver sustancias muy polares en CO_2 supercrítico. No obstante, el uso de cosolventes y/o tensioactivos permite disolver especies polares e iónicas.

CARACTERIZACIÓN

La importancia de las técnicas de caracterización de nanopartículas se justifica por la necesidad de adecuar la formulación a una aplicación terapéutica específica. El tamaño y la distribución granulométrica, la morfología, las propiedades de superficie, la eficiencia de encapsulación, el contenido en principio activo y el perfil de liberación del fármaco encapsulado son los principales parámetros que deben ser caracterizados una vez obtenidas las nanopartículas.

Tamaño y morfología

El tamaño puede ser determinado por diferentes técnicas, de acuerdo con el diámetro aproximado de las nanopartículas (Tabla 2.3). La microscopía óptica convencional no es adecuada para la caracterización de nanopartículas porque su resolución está limitada a 1 □m. Por lo tanto, el tamaño de los sistemas nanoparticulados debe ser evaluado mediante microscopía electrónica o difractometría de láser (*light scattering).*

En particular, la microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy-SEM*), además del tamaño, permite estudiar la morfología de las nanopartículas (102). A modo de ejemplo, en la Figura 2.7, se muestra una imagen de nanopartículas de PLGA obtenida por SEM. En esta técnica, la muestra es recubierta (con oro o platino) y utilizada como conductor eléctrico. Los electrones emitidos de la muestra nanoparticulada bajo un vacío elevado son detectados y se forma la imagen. Sin embargo, las propiedades de la muestra pueden verse modificadas debido al recubrimiento, y al alto vacío al que se ve sometida (103). El análisis morfológico llevado a cabo por SEM permite además determinar la distribución del principio activo encapsulado, lo que posibilita una evaluación más detallada de la eficiencia de encapsulación y del comportamiento del fármaco en la superficie o en el compartimento interno de las nanopartículas. Con el uso de SEM, cristales de cromolin sódico pudieron ser visualizados en la superficie de nanopartículas de PLA, lo que indica que este fármaco no ha sido completamente encapsulado en las mismas.

La microscopía electrónica de barrido ambiental (*Environmental scanning electron microscopy-ESEM*) permite la caracterización de una muestra nanoparticulada acuosa sin que sea necesario recubrirla ni utilizar vacío. La microscopía electrónica de transmisión (*Transmission electron microscopy-TEM*) es ampliamente utilizada para la caracterización de nanopartículas (105-107). La muestra puede ser teñida antes de su caracterización mediante TEM, lo que permite la obtención de información adicional sobre su morfología (108). Sin embargo, algunas muestras se deshacen o se dispersan cuando son irradiadas por la fuente de emisión de electrones del microscopio, lo que impide su visualización por TEM. Estas muestras de nanopartículas pueden ser visualizadas mediante TEM tras criofractura, una técnica que consiste en la congelación rápida de la muestra seguida de un corte o fractura de la misma a muy baja temperatura. A continuación, se lleva a cabo el sombreado metálico de la superficie de corte de la muestra y la observación de una réplica de la población muestral con un microscopio electrónico de transmisión. La criofractura asociada a TEM permite una observación del interior de las nanopartículas, así como de la visualización de la estructura interna de las mismas. Sin embargo, es un método muy laborioso, y por tanto, no es adecuado para el análisis de rutina (109). El uso de TEM tras criofractura proporciona mucha información acerca de la estructura interna de nanocápsulas, sobre todo de la cubierta polimérica y de la estructura interna, permitiendo una estimación del grosor de la pared de dicha cavidad (108). Por otro lado, Chávez y col. (110) estudiaron la estructura capsular de nanopartículas de un tamaño inferior a 500 nm por SEM sin tener que recurrir a la criofractura. La microscopía de fuerza atómica (*Atomic force microscopy-AFM*) es otra de las técnicas recomendadas para la evaluación de la morfología de nanopartículas y que ha sido muy utilizada en la caracterización dichos sistemas (111, 112).

El AFM permite rastrear la muestra nanoparticulada, registrando continuamente su topografía mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica.

TABLA 2.3. *Diferentes técnicas empleadas en el análisis del tamaño de partículas.*

Técnica	*Fundamento*	*Intervalo de análisis*	*Ventajas*	*Limitaciones*
SEM (103) (102) (113)	Microscopía electrónica (barrido electrónico).	50 nm — 100 m	Apariencia tridimensional y morfología de la muestra.	Delicada preparación de la muestra y su influencia en el resultado. Necesita alto vacío.
TEM (106) (108) (109)	Microscopía electrónica transmisión (electrónica).	50 nm — 100 m	Mayor capacidad de aumento y mayor resolución que la SEM	Delicada preparación de la muestra y su influencia en el resultado. Apariencia bidimensional. Necesita alto vacío.
ESEM (102) (114)	Microscopía electrónica.	50 nm — 100 m	No necesidad de recubrimiento conductor. Permite trabajar en modo de bajo vacío Elevada resolución y gran profundidad de campo.	Complejidad de operación.
AFM (34) (111) (115)	Microscopía electrónica detecta (fuerzas a nivel atómico).	10 nm — 1 m		Imposibilidad de efectuar barridos muy grandes de la superficie.
Contador Coulter (117)	Señal eléctrica relacionada con el diámetro al pasar la partícula a través de un orificio.	100 nm — 1000 m	Facilidad de operación.	Estrecho rango en escala nanométrica Ajustes y cambio de componentes del aparato para efectuar el análisis a lo largo de un amplio intervalo de diámetros. No proporciona información de la morfología de la muestra. Dispersión de la muestra en un medio electrolítico.

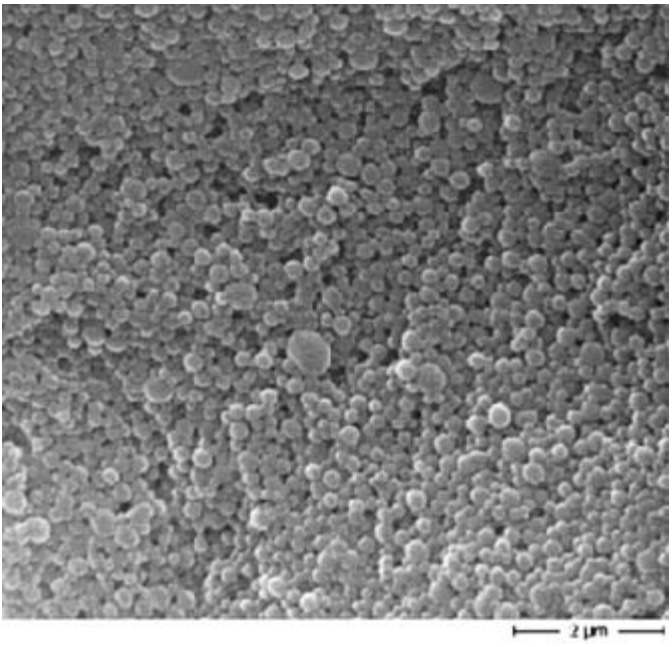


Figura 2.7. *Morfología de nanopartículas de PLGA obtenida por SEM.*

La espectroscopía de correlación fotónica (*Photon Correlation Spectroscopy-PCS*), técnica basada en la difractometría de láser, es ampliamente utilizada en la determinación del tamaño de nanopartículas (115). Comparada con las técnicas basadas en microscopía electrónica, la PCS es una técnica rápida, precisa y que puede ser utilizada en una escala nanométrica de amplio rango. Sin embargo, presenta la desventaja de que si la muestra es polidispersa, esta técnica puede dar lugar a resultados inexactos (102). Por lo tanto, en este caso será necesario evaluar la validez de la información proporcionada por la PCS y el resultado deberá ser confirmado por SEM o por AFM. En definitiva, se deberían combinar distintas técnicas para la determinación del tamaño de las nanopartículas con el fin de obtener una información más completa (113).

Carga superficial

El potencial zeta proporciona información sobre la carga superficial de las nanopartículas, que condiciona las interacciones de las mismas con membranas celulares. El potencial zeta puede determinarse mediante anemometría láser

Doppler o por técnicas electroforéticas empleando la ecuación de Smoluchowski (118). El potencial zeta describe el comportamiento de una dispersión coloidal estabilizada eléctricamente. Valores alrededor de +/- 30 mV son típicos de sistemas coloidales estables. La formación de agregados suele ocurrir cuando las fuerzas de van der Waals son dominantes, lo que resulta en una reducción de los valores del potencial zeta y la pérdida de estabilidad del sistema. El potencial zeta también depende de las condiciones del medio de dispersión, sobre todo de la concentración de electrolitos y del pH (119). Los valores del potencial zeta de nanopartículas de PLA aumentaron 30 mV cuando la concentración de NaCl fue incrementada de 0,02 a 0,1 mol/l. Cuando el pH del medio se incrementó desde un valor de 3 hasta un valor de 6, el potencial zeta de las mismas nanopartículas disminuyó 50 mV (120).

Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (%) es la relación entre la cantidad encapsulada del fármaco y la cantidad total del fármaco añadido en la preparación. El contenido en principio activo revela la cantidad real del fármaco encapsulado por unidad de masa del polímero o de la mezcla polimérica empleada en la formulación. Los procedimientos para la determinación de la eficiencia de encapsulación y del contenido en principio activo dependerán del polímero utilizado y del fármaco encapsulado. En general, el contenido en principio activo se determina tras la disolución de las nanopartículas en un disolvente apropiado seguido de la ultracentrifugación o ultrafiltración de las mismas. El fármaco se cuantifica empleando distintos métodos dependiendo de la naturaleza del principio activo (espectrofotometría-UV, HPLC, ELISA, etc.) (105, 121).

Liberación *in vitro*

La liberación del fármaco a partir de un sistema polimérico nanoparticulado depende de diversos factores: 1) desorción del fármaco de la superficie de las nanopartículas; 2) difusión del fármaco a través de la matriz polimérica de las nanoesferas; 3) difusión a través de la pared polimérica de las nanocápsulas; 4) erosión de la matriz polimérica; y 5) combinación de los procesos de difusión y erosión (69, 122). Las propiedades de liberación y los mecanismos implicados están basados en el coeficiente de difusión del fármaco y en la velocidad de biodegradación del polímero (123). La difusión en bolsas de diálisis y la se-

paración basada en ultracentrifugación o filtración a presión reducida han sido utilizadas para la determinación del perfil de liberación de fármacos a partir de nanopartículas (124, 125). Las nanocápsulas y las nanoesferas presentan distintos perfiles de liberación debido a la naturaleza del compartimento donde el fármaco está encapsulado (vesicular o matricial). Las nanoesferas encapsulan el principio activo en el interior de la matriz polimérica, lo que produce una distribución uniforme del fármaco, por lo que la liberación desde dicha matriz ocurre mediante la combinación de los procesos de difusión y erosión. Si la difusión ocurre más rápidamente que la degradación de la nanoesfera, el proceso de liberación del fármaco es difusión-dependiente. En caso contrario, la degradación es altamente influyente en el perfil de la liberación (81). En primer lugar, se produce la liberación rápida del fármaco adsorbido en la superficie de la nanopartícula (efecto *burst*) seguido de la liberación más lenta del fármaco atrapado en el interior de las mismas. En general, los sistemas matriciales presentan una cinética de liberación de primer orden (126). En las nanocápsulas, en cambio, el fármaco contenido en el núcleo debe difundir a través de la pared polimérica. La morfología vesicular de este tipo de nanopartículas es responsable de una cinética de liberación de orden cero (127). En general, los estudios de liberación de fármacos a partir de nanopartículas son complicados debido al tamaño nanométrico de dichos sistemas, lo que dificulta la separación de las nanopartículas del medio de liberación (102, 108). La concentración del fármaco en dicho medio se determina a lo largo del tiempo y utilizando el método más adecuado en cada caso y que dependerá de la molécula encapsulada (108).

Análisis complementario

Otras técnicas que se utilizan para la caracterización de los sistemas nanoparticulados son FTIR (128), NMR (129), DSC (62, 130, 131) o XPS (102, 131) (Tabla 2.4). La calorimetría diferencial de barrido (*Differential Scanning Calorimetry, DSC*) puede ser utilizada para evaluar el comportamiento térmico de los componentes de una formulación nanoparticulada, sobre todo modificaciones en algunas propiedades del polímero empleado en la formulación como su temperatura de transición vítrea (T_g), punto de fusión o cambios polimórficos (102, 112). Esta técnica proporciona datos cuantitativos precisos de temperaturas y flujos de calor asociados con las transiciones de fases de la materia como cristalización, fusión y evaporación, o con reacciones químicas como hidrólisis y oxidación (132). Mediante DSC, Hevönen y col. (133) observaron un aumento de la T_g del PLA causado por la presencia de beclometasona encapsulada en nanopartículas preparadas con este poliéster. Utilizando esta técnica se puede evaluar

la compatibilidad del principio activo con el polímero empleado en la formulación, mediante la determinación de la solubilidad del fármaco en el mismo. Los resultados facilitados por DSC y su interpretación pueden ser corroborados por el análisis de la forma (cristalina o amorfa) y del grado de cristalinidad del polímero y del fármaco encapsulado mediante técnicas de difractometría de rayos X (*X ray Diffractometry, XRD*) (134). Con respecto al área de superficie de las nanopartículas, este parámetro puede ser determinado por la técnica de Brunauer, Emmett y Teller (BET) mediante adsorción gaseosa de nitrógeno (112).

TABLA 2.4. *Diferentes técnicas empleadas en la caracterización de sistemas nanoparticulados.*

Parámetro	*Técnica*
Tamaño de partícula	SEM, TEM, ESEM, AFM, PCS
Cristalinidad	XRD, DSC
Carga superficial	Electroforesis, Anemometría láser doppler
Área de superficie	BET
Análisis elemental	Espectroscopia de Fotoelectrones generados por Rayos X (XPS), Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (H-NMR), Espectrofotometría Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)

APLICACIONES

Diagnóstico mediante imagen

En las últimas décadas, técnicas de imagen tales como las basadas en imágenes ópticas, imágenes por resonancia magnética (MRI), imágenes nucleares y los ultrasonidos han sido utilizadas con éxito en diversas aplicaciones médicas. En la actualidad existe un creciente interés en diseñar nuevos tipos de agentes de contraste exógenos que permitan un diagnóstico sensible y satisfactorio de patologías específicas. El mayor inconveniente es que la mayoría de las pruebas de imagen que actualmente se emplean en clínica utilizan compuestos de bajo peso molecular que, a pesar de ofrecer resultados prometedores, tienden a ser inestables, poco específicos, tóxicos y rápidamente eliminados (13). Por ello, se están realizando numerosos esfuerzos para conseguir que estos compuestos sean biocompatibles (135). El desarrollo de agentes de contraste na-

noparticulados está contribuyendo en gran medida al campo del diagnóstico y de la imagen a nivel molecular, ya que estos sistemas proporcionan una mayor estabilidad del agente, toxicidad reducida y semivida más larga (136, 137). Además, se está avanzando en el desarrollo de nanopartículas multifuncionales que contienen tanto agentes de contraste como fármacos y en el marcaje de las mismas con ligandos específicos para conseguir agentes de contraste dirigidos. De esta manera, es posible la liberación localizada del agente terapéutico a la vez que se monitoriza su efectividad. Esta combinación de diagnóstico más terapia, también llamada teragnóstico, posibilitará una terapia individualizada para cada paciente (138).

De entre los diversos materiales que podrían emplearse para este fin, los poliésteres han despertado un gran interés debido sobre todo a su ya mencionada biocompatibilidad. Cabe destacar que a pesar de su amplia utilización en los sistemas de liberación controlada de fármacos (8), hasta el momento existen pocos estudios acerca del uso de nanopartículas de poliésteres como vehículos de agentes de contraste. A continuación, se menciona alguna de las aplicaciones de este tipo de partículas en diversas modalidades de imagen.

Imágenes por resonancia magnética

La MRI ha evolucionado como una de las técnicas más importantes en la radiología clínica. A la hora de obtener este tipo de imágenes, la intensidad de la señal en los tejidos puede manipularse mediante la administración de agentes de contraste. Entre ellos los más utilizados y estudiados son los quelatos de gadolinio y los materiales superparamagnéticos de óxidos de hierro (139).

En cuanto a los primeros, uno de los quelatos más importantes es el gadolinio-ácido dietilenotriamino pentaacético (Gd-DTPA), un agente de contraste positivo aprobado por la FDA. El mayor inconveniente de estos quelatos es que debido a su bajo peso molecular son rápidamente eliminados del sistema circulatorio (140). La conjugación de estos compuestos con polímeros biocompatibles es una de las estrategias que se puede emplear para alterar este comportamiento (13). Así, Doiron y col. (141) desarrollaron nanopartículas de PLGA y PLA-PEG. Estas nanopartículas mostraron una alta capacidad para encapsular el quelato y una liberación sostenida a lo largo de 5 horas. El Gd-DTPA también ha sido vehiculizado en micelas nanométricas compuestas de bloques de un copolímero biodegradable, el ácido poli-L-glutámico-*b*-poliláctico (PG-*b*-PLA) (142). Este tipo de formulaciones podrían

proporcionar la base para la creación de agentes de contraste dirigidos al diagnóstico de patologías específicas. De todas formas, serán necesarios ensayos en modelos animales para determinar la farmacocinética y las propiedades de imagen de estos sistemas.

Las partículas superparamagnéticas de óxidos de hierro fueron introducidas como agentes de contraste poco después de los quelatos de gadolinio. Estas partículas presentan una mayor sensibilidad para la MRI, especialmente para la obtención de imágenes del hígado y bazo pero debido a su tamaño y a que son opsonizadas por las proteínas del plasma suelen ser rápidamente aclaradas por las células fagocíticas, principalmente por las células Kupffer del hígado (143). Para su aplicación biomédica este tipo de nanopartículas suelen recubrirse con materiales biocompatibles hidrofílicos, de manera que puedan formar dispersiones estables en medios acuosos a un pH fisiológico. Se ha descrito el desarrollo de micelas de bloques de copolímeros de PEG-*b*-PCL (144) y de nanopartículas magnéticas de PLLA (145) y PLGA (146, 147) para la encapsulación de agentes de contraste superparamagnéticos. Patel y col. (147) mostraron que tras la inyección de las nanopartículas en conejos, las imágenes de resonancia magnética del hígado obtenidas resultaron tener un contraste mucho más intenso respecto a las imágenes que fueron tomadas sin la utilizar agentes de contraste.

Por otro lado, las micelas poliméricas poseen un gran potencial para combinar la liberación de fármacos antitumorales y el diagnóstico por resonancia magnética (148). Varios grupos han descrito la preparación de micelas de PEG y poliésteres, con diferentes tipos de ligandos, que contienen en su interior doxorrubicina y nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (149-151). En estos trabajos las micelas presentaron una gran afinidad por las células tumorales y una alta sensibilidad para ofrecer imágenes mediante resonancia magnética.

Imagen óptica

En la última década una de las mayores novedades para la obtención de imágenes ópticas ha sido el desarrollo de los nanocristales, también denominados *quantum dots* (QD) (152, 153). Los QD son agentes de contraste inorgánicos fluorescentes que absorben la luz en un amplio rango de longitudes de onda, pero emiten una luz casi monocromática en función de su tamaño y composición. La mayoría de estos materiales contienen al menos un componente metálico tóxico en su núcleo, habitualmente cadmio, lo cual limita su uso clínico. Su solubilidad es otro factor a tener en cuenta, ya que general-

mente se preparan en disolventes orgánicos no polares. Es por ello que estas estructuras deben ser recubiertas con materiales biodegradables y biocompatibles (13, 138). Estos QD se han vehiculizado en nanopartículas poliméricas que llevan folatos conjugados en su superficie (154). Algunos tipos de células cancerosas sobreexpresan receptores para el ácido fólico, por lo que este ácido es un ligando atractivo para dirigir partículas hacia estas células y disminuir los efectos adversos de los QD en las células normales. Los ensayos celulares mostraron que los QD vehiculizados en este tipo de nanopartículas se incorporan en mayor medida en células tumorales de cáncer de mama comparando con su forma libre. Este tipo de formulación podría ofrecer una nueva estrategia para obtener imágenes específicas y sensibles para el diagnóstico del cáncer en sus etapas iniciales.

Técnicas de imagen nuclear

Las técnicas de imagen nuclear ofrecen una sensibilidad muy alta, pero al igual que ocurre en el resto de modalidades, los trazadores que se utilizan tienen una semivida corta, limitando a veces su aplicación. Los polímeros juegan un papel importante a la hora de solucionar este inconveniente, ya que pueden prolongar el tiempo de circulación de los marcadores y pueden ser modificados en función de su aplicación (155).

Un ejemplo de la contribución de los poliésteres en la mejora de esta técnica de imagen son las micelas portadoras de radioisótopos (156). En este trabajo se describe el desarrollo de micelas del copolímero PEO-PCL transportadoras del radioisótopo I^{125}, para obtener imágenes de huesos y médula ósea. Además, para evitar la rápida liberación del isótopo al torrente sanguíneo o la pérdida de radioactividad, se conjugaron químicamente los isótopos a ligandos específicos que estaban unidos a la superficie del copolímero. Los ensayos de biodistribución que se llevaron a cabo en ratones mostraron una retención del 20 % de la actividad original del I^{125} en los huesos una hora después de la administración (156).

Imágenes por ultrasonidos

La imagen por ultrasonidos es una de las técnicas más empleadas ya que es relativamente barata y no requiere tanta infraestructura como en las descritas anteriormente (157). La mayoría de los agentes de contraste de ultrasonido co-

merciales consisten en microburbujas de gas (generalmente perfluorocarbonos) encapsuladas para su administración intravenosa (158). Estos agentes permiten la visualización de la microvascularización pero no son capaces de ofrecer imágenes de capilares muy pequeños ni de estructuras que se encuentran fuera de los vasos sanguíneos. Además, son bastante inestables por lo que sólo se pueden visualizar durante un corto periodo de tiempo (159). Una de las estrategias para obtener agentes de contraste más estables es la encapsulación de perfluorocarbonos líquidos en partículas poliméricas. Mediante una modificación del método de evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión se han podido desarrollar nanopartículas de PLGA para la encapsulación de perfluorocarbonos (14).

Otra ventaja que aportan las nanopartículas es que pueden circular por capilares y atravesar los vasos sanguíneos permitiendo así visualizar estructuras que se encuentran fuera de los mismos. Un uso potencial de estos agentes de contraste es la localización específica de células cancerosas. Se ha hecho especial hincapié en el desarrollo de nanopartículas lo suficientemente pequeñas para atravesar los vasos que alimentan los tumores y que puedan ser unidas a sitios específicos mediante modificaciones en su superficie. La encapsulación de perfluorocarbonos en nanopartículas de PLA que contienen anticuerpos anti-Her2 unidos en su superficie permite obtener una ecogenicidad significativamente superior en las células tumorales de cáncer de mama que sobreexpresan receptores Her2 con respecto a las células control formulación que combina la obtención de imágenes por ultrasonido y quimioterapia mediante micelas que liberan el fármaco al ser expuestas a ultrasonido (160). En un estudio novedoso para el tratamiento del cáncer se ha desarrollado una formulación que combina la obtención de imágenes por ultrasonido y quimioterapia mediante micelas que liberan el fármaco al ser expuestas a ultrasonidos (161). Se detectó una remisión significativa de los tumores en ratones con cáncer de mama tratados con estas micelas de PEG-PLLA que contenían doxorrubicina y perfluoropentano. Además, la ultrasonografía reveló una fuerte ecogenicidad en el centro del tumor que se mantenía durante al menos 4 horas tras la administración intravenosa de la formulación.

Agentes multimodales

Las técnicas de imágenes son muy valiosas para el diagnóstico temprano de algunas patologías, pero además resultaría muy útil disponer de agentes de contraste con múltiples propiedades para poder ser detectadas me-

diante diferentes modalidades de imagen (162). Esta combinación de diversas modalidades en un único sistema permite integrar las ventajas y compensar las deficiencias de los sistemas simples de imagen (163). Por ahora, la mayoría de nanoestructuras que se utilizan son vehículos que contienen agentes de contraste para una única modalidad de imagen, pero poco a poco se está avanzando en el diseño de nuevas nanoestructuras multimodales (que contienen múltiples tipos de agentes de contraste) para poder obtener una señal más amplificada. Hasta el momento se han propuesto agentes bimodales tanto de PLGA (164-166) como de PCL (167), que ofrecen contraste para técnicas ópticas de imagen y de resonancia magnética. Estas partículas poseen una alta sensibilidad (característico de los métodos ópticos de detección) y el potencial de obtener imágenes reales en tres dimensiones (debido a los agentes de contraste para MRI). Se espera que estos sistemas multimodales sirvan para obtener diagnósticos en etapas preoperatorias y que sean a su vez útiles en el periodo postoperatorio, para el análisis directo de las biopsias mediante imagen óptica (168).

TRATAMIENTO

En los últimos años se han investigado y desarrollado numerosas aplicaciones de las nanopartículas de poliésteres en el campo de la biomedicina para el tratamiento de múltiples y muy diversas enfermedades que si bien todavía no han llegado al mercado, algunas de ellas pronto alcanzarán la fase de experimentación clínica, y en los próximos años se incorporarán o reemplazarán a las terapias existentes. Estos sistemas resultan atractivos para su empleo como nuevos tratamientos de enfermedades por la gran versatilidad de los compuestos a encapsular, ya que estas partículas son capaces de incorporar desde pequeñas moléculas de fármaco hasta macromoléculas (como péptidos, proteínas o genes), por la capacidad de proteger la molécula encapsulada así como de liberarla de manera controlada y con una cinética dependiente de la composición de la formulación, además de poder dirigir las partículas al tejido, célula u orgánulo intracelular adecuado, y por el hecho de ser totalmente biocompatibles y biodegradables. Además, tal y como se describe a continuación, estos sistemas mejoran la biodisponibilidad oral de muchos compuestos, son capaces de solubilizar fármacos para su administración intravascular y reducen la toxicidad asociada a determinadas moléculas. En la tabla 2.5 se indica un breve resumen de las principales aplicaciones descritas en la bibliografía para estas partículas.

TABLA 2.5. *Tabla resumen de las principales aplicaciones de nanopartículas de poliésteres en biomedicina.*

Enfermedades y fármacos aplicados	Polímero	Referencias
Infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias		
Leishmania		
Anfotericina B	PLGA	(169)
PCL	(170)	
Primaquina	PLA	(171)
Pentamidina	PLA	(17)
Atovacuona	PLA	(172)
Arjunglucósido I (4-epi-sericósido)	PLA	(173)
Micobacterias		
Estreptomicina	PLGA	(26, 175)
Rifampicina, isoniazida y pirazinamida	PLGA	(176)
Brucella		
Gentamicina	PLGA	(22, 177)
Otros antibióticos		
Ciprofloxacino testado frente a *Escherichia coli*	PLGA	(178)
Nafcilina testado frente a *Staphylococcus aureus*	PLGA	(179)
Cloranfenicol	PLGA	(180)
Rifampicina testado frente a bacterias gram positivas y negativas	PLGA	(181)
Cáncer		
5-FU	PLGA	(182)
PCL	(60)	
Paclitaxel	PLGA	(25, 39, 52, 183-186)
PCL	(60)	
Cisplatino	PLGA	(24, 187-190)
PCL	(198)	
Doxorubicina	PLGA	(191-193, 201)
PCL	(193)	
Camptotecina	PLGA	(194)
9-nitrocamptotecina	PLGA	(16)
Docetaxel	PLGA	(49, 195)
Adriamicina	PLGA	(196)
Tamoxifeno	PCL	(62, 197)
Taxol	PCL	(199)
Oridonina	PCL	(200)
Partículas dirigidas al tumor		
Inmuno-nanopartículas	PLGA	(184, 194, 202-204)

Fragmento TTC de la toxina C del tétanos	PLGA	(205)
A10 Aptámero	PLGA	(206)
Radioterapia (Rhenio (^{186}Re, ^{188}Re))	PLLA	(207)
Agentes fotosensibilizadores		
meso-tetrafenilpofolactol	PLGA	(208)
Zinc (II) ftalocianina	PLGA	(209)
Restenosis		
Agente antiproliferativo U-86983	PLGA	(211)
Lisinopril	PLGA	(212)
Paclitaxel	PLGA	(213)
Dexametasona y rapamicina	PLGA	(94)
Alendronato	PLGA	(214)
Trifostina	PLGA	(215)
Terapia génica frente a restenosis		
proteína quimiotáctica de monocitos 1	PLGA	(216)
receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas	PLGA	(217)
Vacunas		
Hepatitis B	PLGA	(23, 220, 221, 223, 224)
Difteria	PLGA	(225)
Helicobacter pilori	PLGA	(20)
Rotavirus	PLGA	(226)
Tétanos	PLGA	(10)
Dirigir el antígeno a las células presentadoras de antígeno	PLGA	(10, 227-229)
Nuevos compuestos adyuvantes en vacunación (CpG oligodeoxinucleotido)	PLGA	(230)
Vacuna antitumoral	PLGA	(231)
Vacunas de DNA	PLGA	(238, 252-254)
Terapia génica		
Inducir la expresión de genes mediante plásmidos de DNA	PLGA	(18, 19, 237-241)
Inhibir la expresión de determinados genes		
Mediante oligonucleótidos antisentido	PLGA	(216, 217, 242, 243)
Mediante RNA de interferencia (siRNA)	PLGA	(244-246)
Terapia combinada; (Liberación fármaco (paclitaxel) y (siRNA)	PLC/PbAE	(247)
Administración de péptidos y proteínas		
Insulina	PLGA	(15, 21, 79, 258, 260, 261)
Ciclosporina A	PLGA	(259)
Calcitonina	PLGA	(263)
Interferón-α	PLGA	(264)
Anticuerpo monoclonal 3D8 scFv	PLGA	(265)
Superóxido dismutasa	PLGA	(266)
L-asparraginasa, catalasa, glucosa oxidasa	PHBV	(47)

Tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias

Una de las ventajas debidas al tamaño de las nanopartículas, es su captación por parte del sistema fagocítico mononuclear. Así, se ha aprovechado esta característica para su empleo como vector de fármacos dirigidos a estas células. En el caso de Leishmania, un parásito intracelular obligado, se han encapsulado diversos fármacos como la anfotericina B en nanopartículas de PLGA (169) o PCL (170) o la primaquina (171), la pentamidina (17) y la atovacuona (172) en nanopartículas de PLA para su liberación a nivel intracelular en macrófagos. Además, la administración subcutánea de partículas de PLA con el arjunglucósido I (4-epi-sericósido) (173) disminuyó en un 75% la carga de parásitos en el bazo en un modelo in vivo de hamster, con respecto al 38% de fármaco libre. La administración de partículas de PLA vacías, disminuyó en un 25% la carga de parásito, probablemente debido al propio efecto adyuvante del polímero. Asimismo, la incorporación del fármaco en las partículas, redujo el efecto hepatotóxico y nefrotóxico asociado al fármaco (173).

Se ha descrito además el uso de nanopartículas de PLGA para la administración en infecciones bacterianas intracelulares como micobacterias (174), para la cual se ha testado la administración oral del antibiótico estreptomicina (26, 175) así como nanopartículas conteniendo tres fármacos eficaces contra esta bacteria (la rifampicina, la isoniazida y la pirazinamida) y administradas por vía pulmonar (176). En este último caso, tras la administración de las nanopartículas se mantuvieron niveles terapéuticos de fármaco durante 6-8 días en plasma, y hasta 11 días en los pulmones. La encapsulación en nanopartículas de PLGA permitió prolongar significativamente la semivida de eliminación de estos compuestos comparada con su administración oral, y ninguna micobacteria pudo ser detectada en los pulmones tras 5 dosis de tratamiento. Otro caso de infección bacteriana intracelular para la que se ha estudiado el uso de nanopartículas de PLGA con getamicina es la Brucelosis (22, 177). Otros antibióticos como el ciprofloxacino (178), la nafcilina (179), el cloranfenicol (180), y la rifampicina (181), han sido también encapsulados en este tipo de sistemas.

Cáncer

Un campo de investigación de creciente interés es la aplicación de estas nanopartículas en la terapia frente al cáncer. El empleo de nanopartículas de poliésteres se fundamenta en su capacidad de disminuir la toxicidad sistémica intrínseca de los agentes quimioterápicos, hecho que limita en gran parte la dosis

administrada a los pacientes, así como la mejora de la eficacia de los tratamientos. Las nanopartículas son dirigidas al foco del tumor, desde el que van liberando de manera controlada el fármaco antineoplásico, prolongando la semivida del fármaco y ejerciendo una acción local.

Existen múltiples ejemplos de estos fármacos antineoplásicos encapsulados en partículas de PLGA [5-FU (182), paclitaxel (25, 39, 52 183-186), cisplatino (24, 187-190), doxorubicina (191-193), camptotecina (194), 9-nitrocamptotecina (16), docetaxel (49, 195), adriamicina (196)], o en nanopartículas de PCL como el tamoxifeno (62, 197), cisplatino (198), taxol (199), doxorubicina (193), oridonina (200) o 5-FU y paclitaxel (60), etc.

Las nanopartículas pueden ser administradas por diferentes vías; por vía oral se obtiene un aumento significativo de la biodisponibilidad de fármacos antineoplásicos que presentan una baja absorción y/o una elevada toxicidad cuando se administran de forma libre. Administrando el fármaco en nanopartículas se consiguen espaciar las administraciones del quimioterápico, reduciendo considerablemente los efectos secundarios asociados a nivel gastrointestinal. Administradas por vía intravenosa las nanopartículas han sido utilizadas para el tratamiento de tumores cerebrales. Nanopartículas de PLGA cubiertas de polisorbato 80 o poloxámero 188 fueron capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y liberar doxorubicina aumentando significativamente la esperanza de vida en ratas con glioblastoma (201) y reduciendo considerablemente la cardiotoxicidad y la toxicidad testicular asociada a la administración del fármaco libre. El transporte del fármaco a través de la barrera hematoencefálica por parte de las nanopartículas parece ser debido a una interacción mediada por receptor en las células endoteliales del capilar cerebral, facilitada por ciertas apolipoproteínas del plasma adsorbidas a las nanopartículas a lo largo de su transporte por la sangre (201).

Además, dada la elevada toxicidad de los fármacos antineoplásicos, se han realizado múltiples aproximaciones para dirigir estas partículas de manera específica al tumor. Así, se han incorporado a la formulación anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos dirigidos frente a epítopos propios sobreexpresados o expresados únicamente por el tumor (inmuno-nanopartículas) (184, 194, 202-204), el fragmento TTC de la toxina C del tétanos para dirigirlas al sistema nervioso central (205), u otros ligandos como el aptámero A10 (206) molécula que se une a un antígeno específico presente en la membrana de células cancerígenas de próstata. Esta acción dirigida aumenta la biodisponibilidad del fármaco en el lugar de acción, reduciendo a la vez los efectos secundarios del tratamiento.

Asimismo, el empleo de nanopartículas en medicina nuclear se ha extendido al tratamiento del cáncer en el campo de la radioterapia. Se ha descrito recientemente la encapsulación en nanopartículas de poliésteres de radioisótopos como el Rhenio (^{186}Re, ^{188}Re) (207). La implantación mediante inyección intratumoral de estas partículas, permite que la radiación quede localizada y restringida a la zona de la masa tumoral irradiada por las propias nanopartículas.

Otro campo en el que se está investigando a fin de disminuir los efectos tóxicos de la terapia antitumoral, es el empleo de agentes fotosensibilizadores, moléculas capaces de generar especies reactivas del oxígeno citotóxicas, únicamente cuando son excitadas a una longitud de onda determinada. Nanopartículas de PLGA se formularon incorporando diversos fotosensibilizadores como el meso-tetrafenilpofolactol (208) o el Zinc (II) ftalocianina (209). En algunos casos, las partículas no son fototóxicas, y sólo tras la internalización de la partícula en la célula diana el fotosensibilizador es liberado y resulta entonces sensible a la acción de la excitación a longitud de onda adecuada.

Restenosis

La restenosis es una enfermedad en la que se produce el estrechamiento y reobstrucción de una arteria, que experimentan algunos pacientes tras haberse sometido a un procedimiento de angioplastia. La restenosis se produce cuando la arteria se vuelve a estrechar debido a un crecimiento del tejido cicatricial en la pared interior de la arteria en el lugar de la cirugía como resultado del trauma mecánico originado por la intervención quirúrgica. Se han descrito diversos compuestos para el tratamiento de esta enfermedad, pero ninguno de ellos ha conseguido su validación clínica, ya que la administración sistémica de los mismos resulta en una insuficiente concentración en el lugar del daño arterial (210). Por ello, la administración controlada y sostenida de estos compuestos liberados desde nanopartículas implantadas en el lugar de la intervención quirúrgica se ha postulado como una alternativa con grandes posibilidades de éxito para el tratamiento de esta enfermedad. El tamaño de las nanopartículas permite su penetración en la pared arterial, desde donde se puede liberar el fármaco, alcanzado así un mayor efecto terapéutico. Diversas moléculas han sido encapsuladas en nanopartículas de PLGA para ser empleadas en el tratamiento de la restenosis, tales como el agente antiproliferativo U-86983, (211), lisinopril (212), paclitaxel (213), dexametasona y rapamicina (94), alendronato (214) o la trifostina (215). También se han descrito trabajos de liberación intravascular, para la posterior internalización intracelular de nanopartículas encapsulando plásmi-

dos u oligodeoxinucleótidos antisentido, con el fin de inhibir la expresión de genes implicados en la enfermedad, como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (216) y el receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFbetaR-AS) (217). Además, la modificación de la superficie de la nanopartícula con la incorporación de compuestos como la heparina o el bromuro de didodecilmetilamonio (DMAB) permite la localización de las partículas en la pared arterial (211, 218).

Vacunación

En los últimos años se ha estudiado la encapsulación o adsorción de antígenos en la superficie de nanopartículas biodegradables como una alternativa al adyuvante tradicional alum con el objetivo de desarrollar mejores vacunas y reducir tanto la frecuencia como el número de dosis requeridas para la inmunización. Además se ha estudiado el empleo de nuevas rutas y vías de administración de vacunas que resulten más seguras para el paciente. Las nanopartículas que contienen antígeno encapsulado pueden ser empleadas como un adyuvante eficaz, dado que pueden actuar como reservorio y liberar el antígeno de manera sostenida, así como protegerlo de la degradación y dirigirlo a las mucosas en el caso de la inmunización oral, nasal o pulmonar, o a las células presentadoras de antígeno en el caso de las inoculaciones parenterales. Asimismo, las nanopartículas pueden incorporar otros adyuvantes en la formulación, que puedan aumentar o modular la respuesta inmune. La posibilidad de dirigir las nanopartículas a las mucosas (ya sea por la vía oral, nasal o pulmonar), mimetiza, al menos en parte, la vía natural de entrada al huésped de la mayoría de virus y bacterias, aumentando la eficacia.

Se han llevado a cabo diversos estudios para desarrollar vacunas frente a diferentes enfermedades, empleando nanopartículas de PLGA. Es el caso de la hepatitis B, una enfermedad que produce la inflamación del hígado y que afecta casi al 5% de la población mundial (8). Entre un 5-10% de las infecciones agudas de esta enfermedad en adultos y hasta el 90% en el caso de niños se convierten en crónicas (219) debido a la falta de un tratamiento específico. Estos datos muestran cómo la vacunación se convierte en el único método para prevenir la expansión del virus. Además, el poder dirigir el tipo de respuesta inmune a conseguir es relevante en este caso, ya que una vez establecida la cronicidad de la enfermedad, la respuesta inmune celular resulta curativa para esta enfermedad, pero la respuesta humoral puede resultar perjudicial. Así, nanopartículas de PLGA encapsulando el antígeno viral HBcAg se administraron a ra-

tones con o sin el inmunomodulador monofosfolípido A que favorece la respuesta Th1, obteniéndose mejores resultados de producción de interferón-γ con el inmunomodulador que en ausencia del mismo (220). La capacidad de dirigir una respuesta inmune de tipo Th1 por parte de las nanopartículas de PLGA encapsulando el mismo antígeno HBcAg se demostró nuevamente en los trabajos de Lutsiak y col. (23). Estudios recientes demostraron la presencia de anticuerpos anti-HB a tiempos significativamente más tempranos en ratones inmunizados con el antígeno HbsAg encapsulado en nanopartículas de PLGA que administrado de forma libre (221). Otros trabajos de desarrollo de micro y nanopartículas de PLGA para su empleo como vacunas frente a la hepatitis B han sido recogidos por Bharali y col. (222). También se han desarrollado vacunas de nanopartículas de PLGA para esta enfermedad encapsulando el antígeno HBcAg para su administración oral, dirigiendo de manera específica las nanopartículas a las células M en las placas de Peyer, mediante el empleo de la lectina Ulex europaeus l en un caso (223), o la lectina proveniente de la Arachis hipogea en otro (224), obteniéndose mejores resultados en el caso de las partículas dirigidas a las células M que las no dirigidas, y un título de anticuerpos anti-HBsAg en suero por parte de las nanopartículas dirigidas y administradas oralmente, comparable al obtenido al inyectar el antígeno por vía intramuscular, junto con el adyuvante alum.

Se han descrito además estudios de vacunas empleando nanopartículas de PLGA, PCL y una mezcla de ambos polímeros, para la inmunización por vía intranasal e intramuscular frente a difteria (225), mediante nanopartículas de PLGA para la inmunización por vía oral frente a Helicobacter pilori (20) y rotavirus (226), y para el tétanos mediante inmunización tanto por vía oral como nasal (10).

Otros trabajos tienen por objeto conseguir un modelo de vacuna que permita dirigir el antígeno a las células presentadoras de antígeno (células dendríticas) (227-229), y otra línea de investigación es el desarrollo de nuevos compuestos que puedan ser coencapsulados en las nanopartículas de PLGA para ser empleados como adyuvantes en la formulación a fin de modular la respuesta inmune (230).

Además de su empleo como terapia preventiva en enfermedades infecciosas, también se ha estudiado el empleo de vacunas para estimular el sistema inmune en la terapia frente al cáncer. Diversos antígenos tumorales han sido encapsulados en nanopartículas de PLGA para eliminar la tolerancia a auto-antígenos tumorales, o para potenciar al sistema inmune frente a estos antígenos tumorales (231).

Terapia génica

Las nanopartículas poliméricas de PLGA han sido empleadas para el desarrollo de vectores no virales en terapia génica. Los vectores virales presentan problemas de inmunogenicidad, además de su posible integración en el genoma celular y la limitación del material genético que son capaces de incorporar. En los últimos años se han descrito múltiples vectores no virales modificados con lípidos catiónicos, polímeros catiónicos (232-236), etc. Sin embargo, el empleo de las nanopartículas de poliésteres como vectores garantiza una mayor estabilidad, una mayor duración de la expresión génica y sobre todo una menor citotoxicidad al emplear polímeros biodegradabes y biocompatibles. De hecho, hoy en día se valora la importancia de la seguridad del vector de expresión al mismo nivel que la eficiencia de expresión génica para el éxito de la terapia génica (210). Así, se han descrito trabajos tanto para inducir la expresión de genes mediante plásmidos de DNA (18, 19, 237-241), como para inhibir la expresión de determinados genes mediante oligonucleótidos antisentido (216, 217, 242, 243) o RNA de interferencia (siRNA) (244-246) liberados desde estos sistemas. Incluso se han descrito trabajos en la lucha contra el cáncer en los que se emplea una terapia combinada de liberación controlada del fármaco antineoplásico paclitaxel desde nanopartículas de PCL junto a silenciamiento de genes mediante la liberación de moléculas de siRNA desde nanopartículas de poli-beta-amino-ésteres (PbAE) a fin de obtener un mayor efecto terapéutico (247).

Se ha demostrado que el empleo de nanopartículas de PLGA posee numerosas ventajas con respecto a otros vectores no virales convencionales como la polietilenimina: no son citotóxicas e incrementan significativamente la expresión del transgén (18, 19) ya que la duración y la velocidad de liberación del material genético desde las nanopartículas puede ser modulado modificando los componentes de la formulación; la relación láctico/glicólico, el peso molecular del polímero y la composición de la formulación. Al igual que para otras aplicaciones biomédicas, la liberación intracelular sostenida en el tiempo del material genético y la posibilidad de modificar las características de la superficie de las nanopartículas recubriéndolas con ligandos u otro tipo de sustancias que dirijan las partículas a las células diana, ofrece una mejora sustancial con respecto al empleo de otros vectores. Como se ha mencionado anteriormente, la internalización intracelular de las nanopartículas depende en gran medida de las características de la superficie de las mismas, incluyendo el potencial de membrana, hidrofilicidad, etc. que también puede ser modificadas. De hecho, la carga de la superficie de las nanopartículas es la característica que les permite escapar de los endolisosomas una vez que son internalizadas en las células (248);

así, variando la carga de la superficie de la partícula se puede dirigir potencialmente al lisosoma o al citoplasma. Se ha especulado incluso con la posibilidad de incorporar señales de localización a orgánulos específicos para dirigir las nanopartículas en el interior celular, como la señal de localización nuclear en el caso de la terapia génica (210), a fin de conseguir mejorar la eficiencia de transfección. A su vez, la internalización de las nanopartículas depende de su tamaño, y se ha comprobado que esta característica puede afectar a la eficiencia de transfección de plásmidos de DNA (249). Así, partículas de tamaño inferior a 100 nm presentaron una capacidad de transfección 27 veces superior a nanopartículas de tamaño superior (250). Otro parámetro importante a tener en cuenta en la formulación es el peso molecular del polímero. Nanopartículas formuladas con un polímero de PLGA de peso molecular 143 kDa mostraron entre 50 y 100 veces mayor eficiencia de transfección génica que aquellas nanopartículas formuladas con el polímero de peso molecular de 12 kDa; las obtenidas con el de 53 kDa presentaron a su vez entre 6 y 15 veces más eficiencia de transfección que las de 12 kDa (251). Este hecho se atribuye a la mayor encapsulación de DNA en las nanopartículas. La composición del polímero puede a su vez afectar a la hidrofobicidad de las nanopartículas y por tanto puede influenciar la encapsulación y la liberación del DNA desde las mismas. Nanopartículas preparadas empleando polímeros más hidrofóbicos (PLA) mostraron una eficiencia de transfección menor que aquellas formuladas con copolímeros de ácido láctico y glicólico (251). La liberación más lenta de DNA desde la matriz polimérica más hidrofóbica puede ser responsable de los menores niveles de transfección génica.

Además de su empleo para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una alteración genética, las nanopartículas biodegradables de PLGA han sido utilizadas para la liberación de plásmidos de DNA que codifiquen para la expresión de proteínas antigénicas como una nueva estrategia de vacunación. Este sistema de vacunación con DNA presenta diversas ventajas como inducir una respuesta humoral y celular, la facilidad de producción y la mejora de la estabilidad del DNA (238, 252-254).

Administración de péptidos y proteínas

El desarrollo experimentado en los últimos años en la tecnología para la producción y purificación de proteínas terapéuticas recombinantes, así como la alta especificidad y actividad de las mismas, ha provocado un creciente interés por el empleo de éstas en el tratamiento de múltiples enfermedades. En el grupo de

proteínas potencialmente terapéuticas se incluyen entre otras, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos, factores neurotróficos, enzimas, etc. (255-257). El desarrollo de esta tecnología, ha forzado el progreso paralelo de tecnologías para la administración de estas macromoléculas, ya que la administración libre de las mismas presenta problemas de baja biodisponibilidad por vía oral debido a su inestabilidad en el tracto gastrointestinal, a que presentan una semivida corta por la acción de las proteasas, y que muchas de ellas no son capaces de difundir a través de determinadas barreras biológicas como la barrera hematoencefálica. En los últimos años se han intensificado los esfuerzos para la encapsulación de estas proteínas y péptidos en nanopartículas de PLGA, ya que estos vectores poliméricos pueden mantener la integridad y la actividad.

Dado que las proteínas son compuestos generalmente hidrofílicos, el método más utilizado para la preparación de estas nanopartículas es la evaporación del disolvente tras la formación de una doble emulsión de tipo A/O/A.

Existen varios obstáculos para la encapsulación de proteínas en nanopartículas de PLA, PLGA, PCL, etc. Uno de los principales problemas es que los productos ácidos de la degradación del polímero, pueden interactuar con las cargas positivas de la proteína pudiendo alterar o bloquear su liberación o exponer a la proteína encapsulada a un pH ácido, pudiendo formar agregados de proteína encapsulada que afectan directamente a la actividad de la misma. Otro de los factores que pueden alterar la estabilidad de la proteína son los procesos de homogenización (por sonicación, alta presión, etc.) necesarios para la formulación de las partículas. Además, las proteínas tienden a migrar a la interfase existente entre la fase acuosa y la orgánica, hecho que puede provocar cambios conformacionales que afectan a la actividad de la proteína, y que pueden transformarla en inmunogénica (210).

Para todo ello se han empleado diferentes estabilizantes en la formulación de las nanopartículas de PLGA, a fin de mantener la integridad y actividad de las proteínas encapsuladas. Así por ejemplo, diferentes estabilizantes como el pluronic F68, trehalosa, bicarbonato sódico fueron empleados para mantener la estabilidad de la insulina, de manera que la liberación controlada de la proteína activa desde las nanopartículas disminuyó de manera prolongada los niveles de glucosa en un modelo animal de rata diabética (21, 28).

Otro de los objetivos perseguidos es la mejora de la biodisponibilidad de péptidos y proteínas administradas por la vía oral. Así por ejemplo, se han descrito trabajos de formulación de nanopartículas de PLGA para mejorar la biodisponibilidad de péptidos como la ciclosporina A (259) y de hormonas como

la insulina (15, 260 261). Otra de las vías de administración estudiadas para la administración de proteínas es la vía pulmonar (262). Así, se han diseñado nanopartículas de PLGA recubiertas de quitosano para la administración pulmonar del péptido calcitonina (263). El recubrimiento con quitosano, polisacárido biodegradable mucoadhesivo, tenía por objeto prolongar la retención de las nanopartículas en el pulmón, tal y como se demostró en un modelo de cobaya. Las partículas recubiertas presentaron un efecto farmacológico en la disminución de los niveles de calcio en sangre significativamente más prolongado que las partículas sin recubrir, y fueron eliminadas más lentamente que las nanopartículas no modificadas. Esta vía también ha sido utilizada para la administración de insulina encapsulada en nanopartículas de PLGA. Así, Kawashima y col. (79) formularon y administraron mediante el empleo de un inhalador nanopartículas de PLGA a cobayas, demostrando una reducción significativa de los niveles de glucosa en sangre, comparado con la administración de una solución de insulina.

Se ha descrito la encapsulación de la citoquina interferón-γ en nanopartículas y micropartículas de PLGA (264) consiguiéndose mantener la integridad estructural y la actividad de la proteína. En el caso de la encapsulación del anticuerpo monoclonal 3D8 scFv en nanopartículas de PLGA (265), el empleo del estabilizante manitol en la formulación permitió mantener la estabilidad y la actividad del anticuerpo. Además, la encapsulación de la enzima superóxido dismutasa en nanopartículas de PLGA, protegió del estrés oxidativo a un cultivo celular de neuronas humanas (266).

CONCLUSIONES

La variedad de polímeros, el desarrollo de nuevos derivados poliméricos y nuevas metodologías para la elaboración de nanopartículas formuladas a partir de poliésteres, han permitido que un gran número de grupos de investigación haya focalizado sus trabajos en el desarrollo de estos sistemas. De los retos pendientes queda por mejorar los redimientos de los proceso de fabricación y sobre todo la adaptación de la fabricación de estos sistemas a escala industrial y en condiciones asépticas, ya que los poliésteres son susceptibles de degradación con la mayoría de los métodos de esterilización habitualmente empleados. Sin embargo y a pesar de ciertas limitaciones, estas nanopartículas representan sistemas prometedores para la administración de un amplio rango de moléculas activas como sustancias antitumorales, antibióticos, péptidos, proteínas, genes, etc, que serán utilizadas tanto en el tratamiento como en el diagnóstico de múltiples patologías.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Kitchell, J.P. & Wise, D.L. (1985) Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug-polymer matrix systems. *Methods Enzymol.* 112: 436-48.

(2) Lewis, D.H. (1990) Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Biodegradable polymers as drug delivery systems (eds. M Chasin, R Langer). pp 1-41. Marcel Dekker, New York.

(3) Wu, X.S. (1995) Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering (ed. We al.). pp 1015-1054. Marcel Dekker, New York.

(4) Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R. & Trehan, A. (2004) Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. J. Pharm.* 278: 1-23.

(5) Pouton, C.W. & Akhtar, S. (1996) Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 18: 133-162.

(6) Portilla-Arias, J.A., Garcia-Alvarez, M., Galbis, J.A. & Munoz-Guerra, S. (2008) Biodegradable nanoparticles of partially methylated fungal poly(beta-L-malic acid) as a novel protein delivery carrier. *Macromolecular Bioscience*. 8: 551-559.

(7) Pinto Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J. & Veiga, F. (2006) Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*. 2: 8-21.

(8) Mundargi, R.C., Babu, V.R., Rangaswamy, V., Patel, P. & Aminabhavi, T.M. (2008) Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Control Release*. 125: 193-209.

(9) Adams, M.L., Lavasanifar, A. & Kwon, G.S. (2003) Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J. Pharm. Sci*. 92: 1343-1355.

(10) Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Hungerer, K.D., Hundt, E. & Kissel, T. (2001) Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide): Evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice. *Pharm. Res*. 18: 352-360.

(11) Lassalle, V. & Ferreira, M.L. (2007) PLA nano- and microparticles for drug delivery: An overview of the methods of preparation. *Macromolecular Bioscience*. 7: 767-783.

(12) Murakami, H., Kawashima, Y., Niwa, T., Hino, T., Takeuchi, H. & Kobayashi, M. (1997) Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of poly(vinylalcohol) on the preparation and properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle. *Int. J. Pharm*. 149: 43-49.

(13) Kim, J.-H., Park, H., Nam, H.Y., Lee, S., Kim, K. & Kwom, I.C. (2007) Polymers for bioimaging. *Prog. Polym. Sci.* 32: 1031-1053.

(14) Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L. & Fattal, E. (2006) Polymeric Nano/Microcapsules of Liquid Perfluorocarbons for Ultrasonic Imaging: Physical Characterization. *Langmuir*. 22: 4397-4402.

(15) Cui, F.D., Tao, A.J., Cun, D.M., Zhang, L.Q. & Shi, K. (2007) Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery. *J. Pharm. Sci.* 96: 421-7.

(16) Derakhshandeh, K., Erfan, M. & Dadashzadeh, S. (2007) Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: factorial design, characterization and release kinetics. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 66: 34-41.

(17) Durand, R., Paul, M., Rivollet, D., Fessi, H., Houin, R., Astier, A. & Deniau, M. (1997) Activity of pentamidine-loaded poly (D,L-lactide) nanoparticles against Leishmania infantum in a murine model. *Parasite*. 4: 331-6.

(18) Gwak, S.J. & Kim, B.S. (2008) Poly(lactic-co-glycolic acid) nanosphere as a vehicle for gene delivery to human cord blood-derived mesenchymal stem cells: comparison with polyethylenimine. *Biotechnol. Lett*. 30: 1177-82.

(19) Kang, S.W., Lim, H.W., Seo, S.W., Jeon, O., Lee, M. & Kim, B.S. (2008) Nanosphere-mediated delivery of vascular endothelial growth factor gene for therapeutic angiogenesis in mouse ischemic limbs. *Biomaterials*. 29: 1109-17.

(20) Kim, S.Y., Doh, H.J., Jang, M.H., Ha, Y.J., Chung, S.I. & Park, H.J. (1999) Oral immunization with Helicobacter pylori-loaded poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Helicobacter*. 4: 33-9.

(21) Kumar, P.S., Saini, T.R., Chandrasekar, D., Yellepeddi, V.K., Ramakrishna, S. & Diwan, P.V. (2007) Novel approach for delivery of insulin loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles using a combination of stabilizers. *Drug Deliv*. 14: 517-23.

(22) Lecaroz, C., Gamazo, C. & Blanco-Prieto, M.J. (2006) Nanocarriers with gentamicin to treat intracellular pathogens. *J. Nanosci. Nanotechnol*. 6: 3296-302.

(23) Lutsiak, M.E., Kwon, G.S. & Samuel, J. (2006) Biodegradable nanoparticle delivery of a Th2-biased peptide for induction of Th1 immune responses. *J. Pharm. Pharmacol*. 58: 739-47.

(24) Mattheolabakis, G., Taoufik, E., Haralambous, S., Roberts, M.L. & Avgoustakis, K. (2008) In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm*.

(25) Mo, Y. & Lim, L.Y. (2005) Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: potentiation of anticancer activity by surface conjugation with wheat germ agglutinin. *J. Control Release*. 108: 244-62.

(26) Pandey, R. & Khuller, G.K. (2006) Nanotechnology based drug delivery system(s) for the management of tuberculosis. *Indian J. Exp. Biol*. 44: 357-66.

(27) Lee, H., Chung, H.J. & Park, T.G. (2007) Perspectives on: local and sustained delivery of angiogenic growth factors. *J. Bioactive and Compatible Polymers*. 22: 89-114.

(28) Jain, R., Shah, N.H., Malick, A.W. & Rhodes, C.T. (1998) Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly(Ester) Devices: Different Preparative Approaches. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 24: 703-727.

(29) Jain, RA. (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 21: 2475-2490.

(30) Thomas, C.B. & Burg, K.J.L. (2004) Tissue Engineering Systems. In: Absorbable and Biodegradable Polymers (eds. WS Shalaby, KJL Burg). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.

(31) Lunt, J. (1998) Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polymer Degradation and Stability*. 59: 145-152.

(32) Bendix, D. (1998) Chemical syntesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability*. 59: 129-135.

(33) Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P., Dellacherie, E., Alonso, M.J., Labrude, P. & Vigneron, C. (1998) Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactid acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J. Controlled Release*. 50: 31-40.

(34) Kumar, M.N.V.R., Bakowsky, U. & Lehr, C.M. (2004) Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*. 25: 1771-1777.

(35) Bittner, B., Ronneberger, B., Zange, R., Volland, C., Anderson, J.M. & Kissel, T. (1998) Bovine serum albumin loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: the influence of polymer purity on particle characteristics. *J. Microencapsulation*. 15: 495-514.

(36) Uhrich, K.E., Cannizzaro, S.M., Langer, R.S. & Shakesheff, K.M. (1999) Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews*. 99: 3181-3198.

(37) Gu, Z.W., Ye, W. & Yang, J. (1992) Biodegradable block copolymer matrices for long acting contraceptive with constant release. *J. Controlled Release*. 22: 3-14.

(38) Lemoine, D. & Preat, V. (1998) Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins. *J. Controlled Release*. 54: 15-27.

(39) Fonseca, C., Simoes, S. & Gaspar, R. (2002) Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control Release*. 83: 273-286.

(40) Dillen, K., Vandervoort, J., Van den Mooter, G., Verheyden, L. & Ludwig, A. (2004) Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharmaceutics*. 275: 171-187.

(41) Ayalasomayajula, S.P. & Kompella, U.B. (2005) Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles sustain retinal drug levels and alleviate diabetes-induced oxidative stress in a rat model. *Eur. J. Pharmacol*. 511: 191-198.

(42) Bergsma, J.E., de Bruijn, W.C., Rozema, F.R., Bos, R.R. & Boering, G. (1995) Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials*. 16: 25-31.

(43) Marchal-Heussler, L., Sirbat, D., Hoffman, M. & Maincent, P. (1993) Poly(epsilon-capralactone) nanocapsule in cartelol ophthalmic delivery. *Pharmaceutical Research*. 10: 386-390.

(44) Calvo, P., Alonso, M.J., Vila-Jato, J.L. & Robinson, J.R. (1996) Improved ocular bioavailability of Indomethacin by novel ocular drug carriers. *J. Pharm. Pharmacol*. 48: 1147-1152.

(45) Alonso, M.J., Garcia, M.L., Epsina, M., Valls, O. & Egea, M.A. (2000) Aclofenac-loaded poly-Â-caprolactone nanocapsules. Effects of coadjuvants on morphological properties and drug entrapment. *Bollettino Cheimico Farmaceutico*. 139: 114-119.

(46) Vanin, M., Santana, C.C., Torriani, I.L., Privelic, T. & Duek, E.A.R. (2004) Estudo da Degradação «In Vitro» de Blendas de Poli(L-Hidroxibutirato) (PHB) / Poli(L-Ácido Latico) (PLLA) na Forma de Filmes. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 14: 187-193.

(47) Baran, E.T., Ozer, N. & Hasirci, V. (2002) Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an in vitro study. *J. Microencapsul*. 19: 363-76.

(48) Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J. & Préat, V. (2006) Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J. Controlled Release*. 116: 1-27.

(49) Senthilkumar, M., Mishra, P. & Jain, N.K. (2008) Long circulating PEGylated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticulate delivery of Docetaxel to solid tumors. *J. Drug Target*. 16: 424-435.

(50) Stolnik, S., Dunn, S.E., Garnett, M.C., Davies, M.C., Coombes, A.G.A., Taylor, D.C., Irving, M.P., Purkiss, S.C., Tadros, T.F., Davis, S.S. & Illum, L. (1994) Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethileneglycol) copolymers. *Pharm. Res*. 11: 1800-1808.

(51) Garinot, M., Fiévez, V., Pourcelle, V., Stoffelbach, F., Rieux, A., Plapied, L., Theate, I., Freichels, H., Jérôme, C., Marchand-Brynaert, J., Schneider, Y.J. & Préat,

V. (2007) PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J. Control Release*. 120; 195-204.

(52) Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O. & Preat, V. (2009) Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *J. Control Release*. 133: 11-7.

(53) Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V. & Langer, R. (1994) Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science,* 263: 1600-1603.

(54) Vila, A., Sanchez, A., Tobio, M., Calvo, P. & Alonso, M.J. (2002) Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Controlled Release*. 78: 15-24.

(55) Dailey, L.A., Wittmar, M. & Kissel, T. (2005) The role of branched polyesters and their modifications in the development of modern drug delivery vehicles. *J. Control Release*. 101: 137-149.

(56) Unger, F., Wittmar, M., Morell, F. & Kissel, T. (2008) Branched polyesters based on poly[vinyl-3-(dialkylamino) alkylcarbamate-co-vinyl acetate-co-vinyl alcohol]-graftpoly(D,L-lactide-co-glycolide): Effects of polymer structure on in vitro degradation behaviour. *Biomaterials*. 29: 2007-2014.

(57) Oster, C.G., Wittmar, M., Bakowsky, U. & Kissel, T. (2006) DNA nano-carriers from biodegradable cationic branched polyesters are formed by a modified solvent displacement method. *J. Control Release*. 111: 371-381.

(58) Oster, C.G., Wittmar, M., Unger, F., Barbu-Tudoran, L., Schaper, A.K. & Kissel, T. (2004) Design of amine-modified graft polyesters for the effective gene delivery using DNA loaded nanoparticles. *Pharm. Res*. 21: 927-931.

(59) Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Klebe, G. & Kissel, T. (2002) Loading of tetanus toxoid to biodegradable nanoparticles from branched poly (sulfobutyl-poly (vinyl alcohol)-g-(lactide-coglycolide)) nanoparticles by protein adsorption: a mechanistic study. *Pharm. Res.* 19: 1105-1113.

(60) Chen, S., Zhang, X.Z., Cheng, S.X., Zhuo, R.X. & Gu, Z.W. (2008) Functionalized amphiphilic hyperbranched polymers for targeted drug delivery. *Biomacromolecules*. 9: 2578-2585.

(61) Cauchetier, E., Deniau, M., Fessi, H., Astier, A. & Paul, M. (2003) Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. *Int. J. Pharm*. 250: 273-281.

(62) Chawla, J.S. &, Amiji, M.M. (2002) Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int. J. Pharm*. 249: 127-138.

(63) Molpeceres, J., Aberturas, M.R. & Guzman, M. (2000) Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: preparation and characterization. *J. Microencapsul*. 17: 599-614.

(64) Packhaeuser, C.B. & Kissel, T. (2007) On the design of in situ forming biodegradable parenteral depot systems based on insulin loaded dialkylaminoalkyl-amine-poly(vinyl alcohol)-g-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *J. Control Release*. 123: 131-40.

(65) Hans, M.L. & Lowman, A.M. (2002) Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targetting. *Curr. Opin. Solid State and Materials Science*. 6: 319-327.

(66) Couvreur, P., Dubernet, C. & Puisieux, F. (1995) Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41: 2-13.

(67) Vanderhoff, J.W., El-Aaser, M.S. & Ugelstad, J. (1979).

(68) Venier-Julienne, M.C. & Benoit, J.P. (1996) Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharm. Acta Helv.* 71: 121-8.

(69) Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. & Rudzinski, W.E. (2001) Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control Release*. 70: 1-20.

(70) ICH guidelines for residual solvents. (1996), pp 67377-67388.

(71) Rouzes, C., Leonard, M., Durand, A. & Dellacherie, E. (2003) Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres. *Colloid Surf.* 32: 125-135.

(72) Mainardes, R.M., Gremiao, M.P., Brunetti, I.L., da Fonseca, L.M. & Khalil, N.M. (2009) Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. *J. Pharm. Sci.* 98: 257-67.

(73) Wehrle, P., Magenheim, B. & Benita, S. (1995) The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution evaluated by means of factorial design. *J. Pharm. Biopharm.* 41: 19-26.

(74) Mainardes, R.M., Chaud, M.V., Gremiao, M.P. & Evangelista, R.C. (2006) Development of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles and evaluation of intestinal permeation by the everted gut sac model. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 3057-61.

(75) Zhao, J., Gou, M., Dai, M., Li, X., Cao, M., Huang, M., Wen, Y., Kan, B., Qian, Z. & Wei, Y. (2008) Preparation, characterization, and in vitro cytotoxicity study of cationic PCL-Pluronic-PCL (PCFC) nanoparticles for gene delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A.*

(76) Koosha, F., Muller, R.H. & Davis, S.S. (1989) Polyhydroxybutyrate as a drug carrier. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6: 117-30.

(77) Astete, C.E. & Sabliov, C.M. (2006) Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 17: 247-89.

(78) Quintanar-Guerrero, D., Allemann, E., Fessi, H. & Doelker, E. (1999) Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *Int. J. Pharm.* 188: 155-64.

(79) Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H. & Kawashima, Y. (1999) Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int. J. Pharm.* 187: 143-52.

(80) Galindo-Rodriguez, S., Allemann, E., Fessi, H. & Doelker, E. (2004) Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm. Res.* 21: 1428-39.

(81) Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Kunou, N. & Kawashima, Y. (1993) Preparation of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method and the drug release behaviour. *J. Control Release*. 25: 89-98.

(82) Mei, L., Sun, H. & Song, C. (2008) Local delivery of modified paclitaxel-loaded poly(epsilon-caprolactone)/pluronic F68 nanoparticles for long-term inhibition of hyperplasia. *J. Pharm. Sci*.

(83) Jimenez, M.M., Pelletier, J., Bobin, M.F., Martini, M.C. & Fessi, H. (2004) Poly-epsilon-caprolactone nanocapsules containing octyl methoxycinnamate: preparation and characterization. *Pharm. Dev. Technol*. 9: 329-39.

(84) van der Ende, A.E., Kravitz, E.J. & Harth, E. (2008) Approach to formation of multifunctional polyester particles in controlled nanoscopic dimensions. *J. Am. Chem. Soc*. 130: 8706-13.

(85) Paiphansiri, U., Tangboriboonrat, P. & Landfester, K. (2006) Polymeric nanocapsules containing an antiseptic agent obtained by controlled nanoprecipitation onto water-in-oil miniemulsion droplets. *Macromol. Biosci*. 6: 33-40.

(86) Olvera-Martinez, B.I., Cazares-Delgadillo, J., Calderilla-Fajardo, S.B., Villalobos-Garcia, R., Ganem-Quintanar, A. & Quintanar-Guerrero, D. (2005) Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: penetration across the stratum corneum. *J. Pharm. Sci*. 94: 1552-9.

(87) Guterres, S.S., Fessi, H., Barratt, G., Puisieux, F. & Devissaguet, J.P. (1995) Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharm. Res.* 12: 1545-7.

(88) Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N. & Benita, S. (1989) Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55: R1-R4.

(89) Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H.D. & Golomb, G. (2009) A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J. Control Release*. 133: 90-5.

(90) Bilati, U., Allemann, E. & Doelker, E. (2005) Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci*. 24: 67-75.

(91) Avgoustakis, K. (2004) Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr. Drug Deliv*. 1: 321-33.

(92) McCarron, P.A., Donnelly, R.F. & Marouf, W. (2006) Celecoxib-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared using a novel and controllable combination of diffusion and emulsification steps as part of the salting-out procedure. *J. Microencapsul*. 23: 480-98.

(93) Allemann, E., Gurny, R. & Doelker, E. (1992) Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *Int. J. Pharm*. 87: 247-253.

(94) Zweers, M.L., Engbers, G.H., Grijpma, D.W. & Feijen, J. (2006) Release of anti-restenosis drugs from poly(ethylene oxide)-poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *J. Control Release*. 114: 317-24.

(95) Ibrahim, H., Bindschaendler, C., Doelker, E., Buri, P. & Gurny, R. (1992) Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *Int. J. Pharm*. 87: 239-246.

(96) Konan, Y.N., Gurny, R. & Allemann, E. (2002) Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *Int. J. Pharm*. 233: 239-52.

(97) Randolph, T.W., Randolph, A.D., Mebes, M. & Yeung, S. (1993) Sub-micrometer-sized biodegradable particles of poly(L-lactic acid) via the gas antisolvent spray precipitation process. *Biotechnol. Prog*. 9: 429-35.

(98) Chattopadhyay, P., Huff, R. & Shekunov, B.Y. (2006) Drug encapsulation using supercritical fluid extraction of emulsions. *J. Pharm. Sci*. 95: 667-79.

(99) Liu, H., Finn, N. & Yates, M.Z. (2005) Encapsulation and sustained release of a model drug, indomethacin, using CO(2)-based microencapsulation. *Langmuir*. 21: 379-85.

(100) Thote, A.J. & Gupta, R.B. (2005) Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release. *Nanomedicine*. 1: 85-90.

(101) Meziani, M.J. & Sun, Y.P. (2003) Protein-conjugated nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution into aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc*. 125: 8015-8.

(102) Peltonen, L. & Hirvonen, J. (2008) Physicochemical characterization of nano- and microparticles. *Current Nanoscience*. 4: 101-107.

(103) Ito, T., Sun, L., Bevan, M.A. & Crooks, R.M. (2004) Comparison of nanoparticle size and electrophoretic mobility measurements using a carbon-nanotube-based coulter counter, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and phase analysis light scattering. *Langmuir.* 20: 6940-6945.

(104) Peltonen, L., Koistinen, P. & Hirvonen, J. (2003) Preparation of nanoparticles by the nanoprecipitation of low molecular weight poly(l)lactide. *STP Pharma. Sci*. 13: 299-304.

(105) Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M.C., Illum, L. & Davis, S.S. (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Controlled Release*. 57: 171-185.

(106) Ren, J., Hong, H., Song, J. & Ren, T. (2005) Particle size and distribution of biodegradable poly-D,L-lactide-co-poly(ethylene glycol) block polymer nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *J. Appl. Polym. Sci*. 98: 1884-1890.

(107) Mosqueira, V.C.F., Legrand, P., Pinto-Alphandary, H., Puisieux, F. & Barratt, G. (2000) Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci*. 89: 614-626.

(108) Gref, R. & Couvreur, P. (2006) Nanocapsules: Preparation, Characterization and Therapeutic Applications. In: Nanoparticulates as drug carries (ed. V Torchilin), pp 255-276. Imperial College Press, London.

(109) Murthy, R.S.R. & Reddy, L.H. (2006) Poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for delivery of anti-cancer drugs. In: Nanotechnology for cancer therapy (ed. MM Amiji). CRC Press, Boca Raton.

(110) Chávez, F., Olvera, B.I., Ganem, A. & Quintanar, D. (2002) Liberación de sustancias lipofílicas a partir de nanocápsulas poliméricas. *Rev. Soc. Quim. Méx*. 46.

(111) Quintanar-Guerrero, D., Allemann, E., Doelker, E. & Fessi, H. (1998) Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm. Res.* 15: 1056.

(112) Sant, S., Nadeau, W. & Hildgen, P. (2005) Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles. *J. Control Release*. 107: 203-214.

(113) Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R. & Delie. F. (2008) Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 69: 1-9.

(114) Abdelwahed, W., Degobert, G. & Fessi, H. (2006) Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 63: 87-94.

(115) Santander-Ortega, M.J., Jódar-Reyes, A.B., Csabac, N., Bastos-González, D. & Ortega-Vinuesa, J.L. (2006) Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms. *J. Colloid and Interface Science*. 302: 522-529.

(116) Pecora, R. (2000) Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *J. Nanoparticle Res*. 2: 123-131.

(117) Stechemesser, H. & Sonntag, H. (2005) Coagulation Kinetics. In: Coagulation and Flocculation. Vol. 126 (eds. H Stechemesser, B Dobias), pp 72-126. CRC Press, Boca Raton.

(118) Liu, W., Sun, D., Li, C., Liu, Q. & Xu, J. (2006) Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. *J. Colloid Interface Sci*. 303: 557-563.

(119) Ishikawa, Y., Katoh, Y. & Ohshima, H. (2005) Colloidal stability of aqueous polymeric dispersions: effect of pH and salt concentration. *Colloid Surf. B*. 42: 53-58.

(120) Hirsjarvi, S., Peltonen, L. & Hirvonen, J. (2006) Layer-by-layer polyelectrolyte coating of low molecular weight poly(lactic acid) nanoparticles. *Colloids and surfaces B-Biointerfaces*. 49: 93-99.

(121) Giannavola, C., Bucolo, C., Maltese, A., Paolino, D., Vandelli, M.A., Puglisi, G., Lee, V.H.L. & Fresta, M. (2003) Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-D,L-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm. Res*. 20: 584-590.

(122) Kreuter, J. (1994) Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker, New York.

(123) Siepmann, J., Faisant, N. & Benoit, J.P. (2002) A new mathematical model quantifying drug release from bioerodible microparticles using Monte Carlo simulations. *Pharm. Res*, 19: 1885-1893.

(124) Magenheim, B., Levy, M.Y. & Benita, S. (1993) A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers - ultrafiltration technique at low pressure. *Int. J. Pharm*. 94: 115-123.

(125) Gref, R., Quellec, P., Sanchez, A., Calvo, P., Dellacherie, E. & Alonso, M.J. (2001) Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 51: 118-118.

(126) Fresta, M., Puglisi, G., Giammona, G., Cavallaro, G., Micali, N. & Furneri, P.M. (1995) Pefloxacine mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: characterization of the colloidal drug carrier formulation. *J. Pharm. Sci.* 84: 895-902.

(127) Betancourt, T., Doiron, A., Kimberly, A.H. & Brannon-Peppas, L. (2009) Controlled Release and Nanotechnology In: Nanotechnology in Drug Delivery (eds. MM Villiers, P Aramwit, GS Kwon), pp 83-312. Springer, New York.

(128) Lu, X.F., Lv, X.Q., Sun, Z.J. & Zheng, Y.F. (2008) Nanocomposites of poly(L-lactide) and surface-grafted TiO2 nanoparticles: Synthesis and characterization. *Eur. Polymer J.* 4: 2476-2481.

(129) Das, S.K., Tucker, I.G., Hill, D.J.T. & Ganguly, N. (1995) Evaluation of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles for mucoadhesive ocular drug delivery. I. Effect of formulation variables on physicochemical characteristics of nanoparticles. *Pharm. Res.* 12: 534-540.

(130) Dubernet, C. (1995) Thermoanalysis of microspheres. *Thermochim. Acta.* 248: 259-269.

(131) Mu, L. & Feng, S.S. (2003) A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J. Controlled Release.* 86: 33-48.

(132) Brown, M.E. (2001) Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications Kluwer Academics, Dordrecht, The Netherlands.

(133) Layre, A.M., Gref, R., Richard, J., Requier, D., Chacun, H., Appel, M., Domb, A.J. & Couvreur, P. (2005) Nanoencapsulation of a crystalline drug. *Int. J. Pharm.* 298: 323-327.

(134) Peltonen, L., Koistinen, P., Karjalainen, M., Hakkinen, A. & Hirvonen, J. (2002) The Effect of Cosolvents on the Formulation of Nanoparticles From Low-Molecular-Weight Poly(l)lactide. *AAPS PharmSciTech.* 3, article 32.

(135) Cormode, D.P., Skajaa, T., Fayad, Z.A. & Mulder, W.J. (2008) Nanotechnology in Medical Imaging. *Probe Design and Applications. Arterioscler Thromb Vasc Biol.*

(136) Matsuura, N. & Rowlands, J.A. (2008) Towards new functional nanostructures for medical imaging. *Med. Phys.* 35: 4474-87.

(137) Sharma, P., Brown, S., Walter, G., Santra, S. & Moudgil, B. (2006) Nanoparticles for bioimaging. *Adv. Colloid Interface Sci.* 123-126: 471-85.

(138) Debbage, P. & Jaschke, W. (2008) Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors. *Histochem. Cell Biol.* 130. 845-75.

(139) Roszek, B., H. d.J.W. & Geertsman, R.E. (2005) Nanotechnology in medical applications: state-of-the art in material an devices. *RIVM Report*, 265001001/2005.

(140) Ersoy, H. & Rybicki, F.J. (2007) Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J. Magn. Reson. Imaging*. 26: 1190-7.

(141) Doiron, A.L., Chu, K., Ali, A. & Brannon-Peppas, L. (2008) Preparation and initial characterization of biodegradable particles containing gadolinium-DTPA contrast agent for enhanced MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 105: 17232-7.

(142) Zhang, G., Zhang, R., Wen, X., Li, L. & Li, C. (2008) Micelles based on biodegradable poly(L-glutamic acid)-b-polylactide with paramagnetic Gd ions chelated to the shell layer as a potential nanoscale MRI-visible delivery system. *Biomacromolecules*. 9: 36-42.

(143) Bulte, J.W. & Kraitchman, D.L. (2004) Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed*. 17: 484-99.

(144) Ai, H., Flask, C., Weinberg, R., Shuai, X., Pagel, M., Farrell, D., Duerk, J. & Gao, J. (2005) Magnetite-loaded polymeric micelles as ultrasensitive magnetic-resonance probes. *AdV. Mater*. 17: 1949-1952.

(145) Hamoudeh, M., Al Faraj, A., Canet-Soulas, E., Bessueille, F., Leonard, D. & Fessi, H. (2007) Elaboration of PLLA-based superparamagnetic nanoparticles: characterization, magnetic behaviour study and in vitro relaxivity evaluation. *Int. J. Pharm*. 338: 248-57.

(146) Lee, S.-J., Jeong, J.-R., Shin, S.-C., Kim, J.-C., Chang, Y.-H., Lee, K.-H., Kim & J.-D. (2005) Magnetic enhancement of iron oxide nanoparticles encapsulated with poly(D,L-lactide-co-glycolide). Colloids and Surface A: *Physicochem. Eng. Aspects*. 225: 19-25.

(147) Patel, D., Moon, Y.J., Chang, Y., Kim, T.J. & Lee, G.H. (2008) Poly(D,L-lactide-co-glycolide) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vivo study as MRI contrast agent. *Colloids and Surface A: Physicochem. Eng. Aspects*. 313-314: 91-94.

(148) Torchilin, V.P. (2002) PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 54: 235-52.

(149) Nasongkla, N., Bey, E., Ren, J., Ai, H., Khemtong, C., Guthi, J.S., Chin, S.F., Sherry, A.D., Boothman, D.A. & Gao, J. (2006) Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano Lett*. 6: 2427-30.

(150) Yang, J., Lee, C.H., Park, J., Seo, S., Lim, E.K., Song, Y.J., Suh, J.S., Yoon, H.G., Huh, Y.M. & Haam, S. (2007) Antibody conjugated magnetic PLGA nanoparticles for diagnosis and treatment of breast cancer. *J. Mater. Chem*. 17: 2695-2699.

(151) Hong, G., Yuan, R., Liang, B., Shen, J., Yang, X. & Shuai, X. (2008) Folate-functionalized polymeric micelle as hepatic carcinoma-targeted, MRI-ultrasensitive delivery system of antitumor drugs. *Biomed. Microdevices*. 10: 693-700.

(152) Efros, A.L. & Rosen, M. (2000) The electronic structure of semiconductor nanocrystals. *Annu. Rev. Mater. Sci*. 30: 475-521.

(153) Murray, C.B., R. K.C. & Bawendi, M.G. (2000) Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annu. Rev. Mater. Sci*. 30: 545-610.

(154) Pan, J. & Feng, S.S. (2008) Targeting and imaging cancer cells by Folate-decorated, quantum dots (QDs)- loaded nanoparticles of biodegradable polymers. *Biomaterials*.

(155) Hamoudeh, M., Kamleh, M.A., Diab, R. & Fessi, H. (2008) Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 60: 1329-46.

(156) Park, Y.J., Lee, J.Y., Chang, Y.S., Jeong, J.M., Chung, J.K., Lee, M.C., Park, K.B. & Lee, S.J. (2002) Radioisotope carrying polyethylene oxide-polycaprolactone copolymer micelles for targetable bone imaging. *Biomaterials*. 23: 873-9.

(157) Schutt, E.G., Klein, D.H., Mattrey, R.M. & Riess, J.G. (2003) Injectable Microbubbles as Contrast Agents for Diagnostic Ultrasound Imaging: The Key Role of Perfluorochemicals13. *Angewandte Chemie International Edition*. 42: 3218-3235.

(158) Raisinghani, A. & DeMaria, A.N. (2002) Physical principles of microbubble ultrasound contrast agents. *Am. J. Cardiol*. 90: 3J-7J.

(159) Kaufmann, B.A. & Lindner, J.R. (2007) Molecular imaging with targeted contrast ultrasound. *Curr. Opin. Biotechnol*. 18: 11-6.

(160) Liu, J., Li, J., Rosol, T.J., Pan, X. & Voorhees, J.L. (2007) Biodegradable nanoparticles for targeted ultrasound imaging of breast cancer cells in vitro. *Phys. Med. Biol*. 52. 4739-47.

(161) Gao, Z., Kennedy, A.M., Christensen, D.A. & Rapoport, N.Y. (2008) Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy. *Ultrasonics*. 48: 260-70.

(162) Mulder, W.J., Cormode, D.P., Hak, S., Lobatto, M.E., Silvera, S. & Fayad, Z.A. (2008) Multimodality nanotracers for cardiovascular applications. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med*. 5 Suppl 2: S103-11.

(163) Cheon, J. & Lee, J.H. (2008) Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology. *Acc. Chem. Res*.

(164) Cheng, F.-Y., Wang, S.P.-H., Su, C.-H., Tsai, T.-L., Wu, P.-C., Shieh, D.-B., Chen, J.-H., Hsieh, P.C.-H. & Yeh, C.-S. (2008) Stabilizer-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for multimodal biomedical probes. *Biomaterials*. 29: 2104-2112.

(165) Lim, Y.T., Noh, Y.W., Han, J.H., Cai, Q.Y., Yoon, K.H. & Chung, B.H. (2008) Biocompatible polymer-nanoparticle-based bimodal imaging contrast agents for the labeling and tracking of dendritic cells. *Small*. 4: 1640-5.

(166) Park, H., Yang, J., Seo, S., Kim, K., Suh, J., Kim, D., Haam, S. & Yoo, K.H. (2008) Multifunctional nanoparticles for photothermally controlled drug delivery and magnetic resonance imaging enhancement. *Small*. 4: 192-6.

(167) Yang, J., Lim, E.K., Lee, H.J., Park, J., Lee, S.C., Lee, K., Yoon, H.G., Suh, J.S., Huh, Y.M. & Haam, S. (2008) Fluorescent magnetic nanohybrids as multimodal imaging agents for human epithelial cancer detection. *Biomaterials*. 29: 2548-55.

(168) Frullano, L. & Meade, T.J. (2007) Multimodal MRI contrast agents. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12: 939-49.

(169) Venier-Julienne, M.C., Vouldoukis, I., Monjour, L. & Benoit, J.P. (1995) In vitro study of the anti-leishmanial activity of biodegradable nanoparticles. *J. Drug Target*. 3: 23-9.

(170) Espuelas, M.S., Legrand, P., Loiseau, P.M., Bories, C., Barratt, G. & Irache, J.M. (2002) In vitro antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(epsilon-caprolactone) nanospheres. *J. Drug Target*. 10: 593-9.

(171) Rodrigues, J.M. Jr., Croft, S.L., Fessi, H., Bories, C. & Devissaguet, J.P. (1994) The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly (d,l-lactide) nanoparticles in Leishmania donovani infected mice. *Trop. Med. Parasitol*. 45: 223-8.

(172) Cauchetier, E., Paul, M., Rivollet, D., Fessi, H., Astier, A. & Deniau, M. (2003) Therapeutic evaluation of free and nanocapsule-encapsulated atovaquone in the treatment of murine visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 97: 259-68.

(173) Tyagi, R., Lala, S., Verma, A.K., Nandy, A.K., Mahato, S.B., Maitra, A. & Basu, M.K. (2005) Targeted delivery of arjunglucoside I using surface hydrophilic and hydrophobic nanocarriers to combat experimental leishmaniasis. *J. Drug Target*. 13: 161-71.

(174) Gaspar, M.M., Cruz, A., Fraga, A.G., Castro, A.G., Cruz, M.E. & Pedrosa, J. (2008) Developments on drug delivery systems for the treatment of mycobacterial infections. *Curr. Top. Med. Chem.* 8: 579-91.

(175) Pandey, R. & Khuller, G.K. (2007) Nanoparticle-based oral drug delivery system for an injectable antibiotic - streptomycin. Evaluation in a murine tuberculosis model. *Chemotherapy.* 53: 437-41.

(176) Pandey, R., Sharma, A., Zahoor, A., Sharma, S., Khuller, G.K. & Prasad, B. (2003) Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 981-6.

(177) Lecaroz, C., Gamazo, C., Renedo, M.J. & Blanco-Prieto, M.J. (2006) Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for gentamicin. *J. Microencapsul.* 23: 782-92.

(178) Jeong, Y.I., Na, H.S., Seo, D.H., Kim, D.G., Lee, H.C., Jang, M.K., Na, S.K., Roh, S.H., Kim, S.I. & Nah, J.W. (2008) Ciprofloxacin-encapsulated poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *Int. J. Pharm.* 352: 317-23.

(179) Pillai, R.R., Somayaji, S.N., Rabinovich, M., Hudson, M.C. & Gonsalves, K.E. (2008) Nafcillin-loaded PLGA nanoparticles for treatment of osteomyelitis. *Biomed. Mater.* 3: 034114.

(180) Halder, K.K., Mandal, B., Debnath, M.C., Bera, H., Ghosh, L.K. & Gupta, B.K. (2008) Chloramphenicol-incorporated poly lactide-co-glycolide (PLGA) nanoparticles: formulation, characterization, technetium-99m labeling and biodistribution studies. *J. Drug Target.* 16: 311-20.

(181) Esmaeili, F., Hosseini-Nasr, M., Rad-Malekshahi, M., Samadi, N., Atyabi, F. & Dinarvand, R. (2007) Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. *Nanomedicine.* 3: 161-7.

(182) Li, X., Xu, Y., Chen, G., Wei, P. & Ping, Q. (2008) PLGA nanoparticles for the oral delivery of 5-Fluorouracil using high pressure homogenization-emulsification as the preparation method and in vitro/in vivo studies. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34: 107-15.

(183) Dong, Y. & Feng, S.S. (2007) Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles prepared by high pressure homogenization for paclitaxel chemotherapy. *Int. J. Pharm.* 342: 208-14.

(184) Kou, G., Gao, J., Wang, H., Chen, H., Li, B., Zhang, D., Wang, S., Hou, S., Qian, W., Dai, J., Zhong, Y. & Guo, Y. (2007) Preparation and Characterization of Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles coated with cationic SM5-1 single-chain antibody. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40: 731-9.

(185) Jin, C., Wu, H., Liu, J., Bai, L. & Guo, G. (2007) The effect of paclitaxel-loaded nanoparticles with radiation on hypoxic MCF-7 cells. *J. Clin. Pharm. Ther.* 32: 41-7.

(186) Jin, C., Bai, L., Wu, H., Liu, J., Guo, G. & Chen, J. (2008) Paclitaxel-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for radiotherapy in hypoxic human tumor cells in vitro. *Cancer Biol. Ther.* 7: 911-6.

(187) Dhar, S., Gu, F.X., Langer, R., Farokhzad, O.C. & Lippard, S.J. (2008) Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 105: 17356-61.

(188) Gryparis, E.C., Hatziapostolou, M., Papadimitriou, E. & Avgoustakis, K. (2007) Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 67: 1-8.

(189) Gryparis, E.C., Mattheolabakis, G., Bikiaris, D. & Avgoustakis, K. (2007) Effect of conditions of preparation on the size and encapsulation properties of PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin. *Drug Deliv*. 14: 371-80.

(190) Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A.G. & Ithakissios, D.S. (2002) PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J. Control Release*. 79: 123-35.

(181) Yoo, H.S., Lee, K.H., Oh, J.E. & Park, T.G. (2000) In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *J. Control Release*. 68: 419-31.

(192) Betancourt, T., Brown, B. & Brannon-Peppas, L. (2007) Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation. *Nanomed*. 2, 219-32.

(193) Yadav, A.K., Mishra, P., Mishra, A.K., Mishra, P., Jain, S. & Agrawal, G.P. (2007) Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedicine*. 3: 246-57.

(194) McCarron, P.A., Marouf, W.M., Quinn, D.J., Fay, F., Burden, R.E., Olwill, S.A. & Scott, C.J. (2008) Antibody targeting of camptothecin-loaded PLGA nanoparticles to tumor cells. *Bioconjug. Chem*. 19: 1561-9.

(195) Esmaeili, F., Ghahremani, M.H., Ostad, S.N., Atyabi, F., Seyedabadi, M., Malekshahi, M.R., Amini, M. & Dinarvand, R. (2008) Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *J. Drug Target*. 16: 415-23.

(196) Davaran, S., Rashidi, M.R., Pourabbas, B., Dadashzadeh, M. & Haghshenas, N.M. (2006) Adriamycin release from poly(lactide-coglycolide)-polyethylene glycol nanoparticles: synthesis, and in vitro characterization. *Int. J. Nanomedicine*. 1: 535-9.

(197) Shenoy, D.B. & Amiji, M.M. (2005) Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int. J. Pharm*. 293: 261-70.

(198) Li, X., Li, R., Qian, X., Ding, Y., Tu, Y., Guo, R., Hu, Y., Jiang, X., Guo, W. & Liu, B. (2008) Superior antitumor efficiency of cisplatin-loaded nanoparticles by

intratumoral delivery with decreased tumor metabolism rate. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 70: 726-34.

(199) Kim, S.Y. & Lee, Y.M. (2001) Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(epsilon-caprolactone) as novel anticancer drug carriers. *Biomaterials*. 22: 1697-704.

(200) Feng, N., Wu, P., Li, Q., Mei, Y., Shi, S., Yu, J., Xu, J., Liu, Y. & Wang, Y. (2008) Oridonin-loaded poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(epsilon-caprolactone) copolymer nanoparticles: preparation, characterization, and antitumor activity on mice with transplanted hepatoma. *J. Drug Target*. 16: 479-85.

(201) Kreuter, J. & Gelperina, S. (2008) Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori*. 94: 271-7.

(202) Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J. & Kristl, J. (2007) Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J. Control Release*. 120: 18-26.

(203) Gao, J., Kou, G., Chen, H., Wang, H., Li, B., Lu, Y., Zhang, D., Wang, S., Hou, S., Qian, W., Dai, J., Zhao, J., Zhong, Y. & Guo, Y. (2008) Treatment of hepatocellular carcinoma in mice with PE38KDEL type I mutant-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles conjugated with humanized SM5-1 F(ab') fragments. *Mol. Cancer Ther*. 7: 3399-407.

(204) Chen, H., Gao, J., Lu, Y., Kou, G., Zhang, H., Fan, L., Sun, Z., Guo, Y. & Zhong, Y. (2008) Preparation and characterization of PE38KDEL-loaded anti-HER2 nanoparticles for targeted cancer therapy. *J. Control Release*. 128: 209-16.

(205) Townsend, S.A., Evrony, G.D., Gu, F.X., Schulz, M.P., Brown, R.H. Jr. & Langer, R. (2007) Tetanus toxin C fragment-conjugated nanoparticles for targeted drug delivery to neurons. *Biomaterials*. 28, 5176-84.

(206) Gu, F., Zhang, L., Teply, B.A., Mann, N., Wang, A., Radovic-Moreno, A.F., Langer, R. & Farokhzad, O.C. (2008) Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 105: 2586-91.

(207) Hamoudeh, M., Salim, H., Barbos, D., Paunoiu, C. & Fessi, H. (2007) Preparation and characterization of radioactive dirhenium decacarbonyl-loaded PLLA nanoparticles for radionuclide intra-tumoral therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 67: 597-611.

(208) McCarthy, J.R., Perez, J.M., Bruckner, C. & Weissleder, R. (2005) Polymeric nanoparticle preparation that eradicates tumors. *Nano Lett*. 5: 2552-6.

(209) Ricci-Junior, E. & Marchetti, J.M. (2006) Preparation, characterization, photocytotoxicity assay of PLGA nanoparticles containing zinc (II) phthalocyanine for photodynamic therapy use. *J. Microencapsul*. 23: 523-38.

(210) Panyam, J. & Labhasetwar, V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 55: 329-47.

(211) Song, C., Labhasetwar, V., Cui, X., Underwood, T. & Levy, R.J. (1998) Arterial uptake of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery: results with an acute dog model. *J. Control Release*. 54: 201-11.

(212) Varshosaz, J. & Soheili, M. (2008) Production and in vitro characterization of lisinopril-loaded nanoparticles for the treatment of restenosis in stented coronary arteries. *J. Microencapsul*. 1-9.

(213) Westedt, U., Kalinowski, M., Wittmar, M., Merdan, T., Unger, F., Fuchs, J., Schaller, S., Bakowsky, U. & Kissel, T. (2007) Poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for local delivery of paclitaxel for restenosis treatment. *J. Control Release*. 119: 41-51.

(214) Cohen-Sela, E., Rosenzweig, O., Gao, J., Epstein, H., Gati, I., Reich, R., Danenberg, H.D. & Golomb, G. (2006) Alendronate-loaded nanoparticles deplete monocytes and attenuate restenosis. *J. Control Release*. 113: 23-30.

(215) Fishbein, I., Chorny, M., Rabinovich, L., Banai, S., Gati, I. & Golomb, G. (2000) Nanoparticulate delivery system of a tyrphostin for the treatment of restenosis. *J. Control Release*. 65: 221-9.

(216) Yang, J., Zeng, Y., Li, Y., Song, C., Zhu, W., Guan, H. & Li, X. (2008) Intravascular site-specific delivery of a therapeutic antisense for the inhibition of restenosis. *Eur. J. Pharm. Sci*. 35: 427-34.

(217) Cohen-Sacks, H., Najajreh, Y., Tchaikovski, V., Gao, G., Elazer, V., Dahan, R., Gati, I., Kanaan, M., Waltenberger, J. & Golomb, G. (2002) Novel PDGFbetaR antisense encapsulated in polymeric nanospheres for the treatment of restenosis. *Gene Ther.* 9: 1607-16.

(218) Labhasetwar, V., Song, C., Humphrey, W., Shebuski, R. & Levy, RJ. (1998) Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: effect of surface modifications. *J. Pharm. Sci*. 87: 1229-34.

(219) Merican, I., Guan, R., Amarapuka, D., Alexander, M.J., Chutaputti, A., Chien, R.N., Hasnian, S.S., Leung, N., Lesmana, L., Phiet, P.H., Sjalfoellah Noer, H.M., Sollano, J., Sun, H.S. & Xu, D.Z. (2000) Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 15: 1356-61.

(220) Chong, C.S., Cao, M., Wong, W.W., Fischer, K.P., Addison, W.R., Kwon, G.S., Tyrrell, D.L. & Samuel, J. (2005) Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. *J. Control Release*. 102: 85-99.

(221) Bharali, D.J., Pradhan, V., Elkin, G., Qi, W., Hutson, A., Mousa, S.A. & Thanavala, Y. (2008) Novel nanoparticles for the delivery of recombinant hepatitis B vaccine. *Nanomedicine*. 4, 311-7.

(222) Bharali, D.J., Mousa, S.A. & Thanavala, Y. (2007) Micro- and nanoparticle-based vaccines for hepatitis B. *Adv. Exp. Med. Biol*. 601: 415-21.

(223) Gupta, P.N., Khatri, K., Goyal, A.K., Mishra, N. & Vyas, S.P. (2007) M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *J. Drug Target*. 15: 701-13.

(224) Gupta, P.N., Mahor, S., Rawat, A., Khatri, K., Goyal, A. & Vyas, S.P. (2006) Lectin anchored stabilized biodegradable nanoparticles for oral immunization 1. Development and in vitro evaluation. *Int. J. Pharm*. 318: 163-73.

(225) Singh, J., Pandit, S., Bramwell, V.W. & Alpar, H.O. (2006) Diphtheria toxoid loaded poly-(epsilon-caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems. *Methods*. 38: 96-105.

(226) Nayak, B., Panda, A.K., Ray, P. & Ray A.R. (2008) Formulation, characterization and evaluation of rotavirus encapsulated PLA and PLGA particles for oral vaccination. *J. Microencapsul*. 1-12.

(227) Diwan, M., Elamanchili, P., Lane, H., Gainer, A. & Samuel, J. (2003) Biodegradable nanoparticle mediated antigen delivery to human cord blood derived dendritic cells for induction of primary T cell responses. *J. Drug Target*. 11: 495-507.

(228) Elamanchili, P., Diwan, M., Cao, M. & Samuel, J. (2004) Characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine*. 22: 2406-12.

(229) Elamanchili, P., Lutsiak, C.M., Hamdy, S., Diwan, M. & Samuel, J. (2007) «Pathogen-mimicking» nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *J. Immunother*. 30: 378-95.

(230) Diwan, M., Elamanchili, P., Cao, M. & Samuel, J. (2004) Dose sparing of CpG oligodeoxynucleotide vaccine adjuvants by nanoparticle delivery. *Curr. Drug Deliv*. 1: 405-12.

(231) Hamdy, S., Molavi, O., Ma, Z., Haddadi, A., Alshamsan, A., Gobti, Z., Elhasi, S., Samuel, J. & Lavasanifar, A. (2008) Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8+ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine*. 26: 5046-57.

(232) Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. (2006) Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control Release*. 114: 100-9.

(233) Zhang, S., Zhao, B., Jiang, H., Wang, B. & Ma, B. (2007) Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J. Control Release*. 123: 1-10.

(234) Goyal, A.K., Khatri, K. & Vyas, S.P. (2008) Patents on non-viral mediated gene delivery. *Recent Pat DNA Gene Seq*. 2: 44-60.

(235) Montier, T., Benvegnu, T., Jaffres, P.A., Yaouanc, J.J. & Lehn, P. (2008) Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: a series of bio-inspired lipids as an example. *Curr. Gene Ther.* 8: 296-312.

(236) Wasungu, L. & Hoekstra, D. (2006) Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Control Release*. 116, 255-64.

(237) Yi, F., Wu, H. & Jia, G.L. (2006) Formulation and characterization of poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticle containing vascular endothelial growth factor for gene delivery. *J. Clin. Pharm. Ther.* 31: 43-8.

(238) Csaba, N., Sanchez, A. & Alonso, M.J. (2006) PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. *J. Control Release*. 113: 164-72.

(239) Gvili, K., Benny, O., Danino, D. & Machluf, M. (2007) Poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for DNA delivery: waiving preparation complexity and increasing efficiency. *Biopolymers*. 85: 379-91.

(240) He, Q., Yuan, W.M., Liu, J. & Zhang, Z.R. (2008) Study on in vivo distribution of liver-targeting nanoparticles encapsulating thymidine kinase gene (TK gene) in mice. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 19: 559-65.

(241) Basarkar, A. & Singh, J. (2009) Poly (lactide-co-glycolide)-Polymethacrylate Nanoparticles for Intramuscular Delivery of Plasmid Encoding Interleukin-10 to Prevent Autoimmune Diabetes in Mice. *Pharm. Res*. 26: 72-81.

(242) Nafee, N., Taetz, S., Schneider, M., Schaefer, U.F. & Lehr, C.M. (2007) Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine*. 3: 173-83.

(243) Taetz, S., Nafee, N., Beisner, J., Piotrowska, K., Baldes, C., Murdter, T.E., Huwer, H., Schneider, M., Schaefer, U.F., Klotz, U. & Lehr, C.M. (2008) The influence of chitosan content in cationic chitosan/PLGA nanoparticles on the delivery efficiency of antisense 2'-O-methyl-RNA directed against telomerase in lung cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm*.

(244) Yuan, X., Li, L., Rathinavelu, A., Hao, J., Narasimhan, M., He, M., Heitlage, V., Tam, L., Viqar, S. & Salehi, M. (2006) SiRNA drug delivery by biodegradable polymeric nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol*. 6: 2821-8.

(245) Nguyen, J., Steele, T.W., Merkel, O., Reul, R. & Kissel, T. (2008) Fast degrading polyesters as siRNA nano-carriers for pulmonary gene therapy. *J. Control Release*.

(246) Katas, H., Cevher, E. & Alpar, H.O. (2008) Preparation of polyethyleneimine incorporated poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles by spontaneous emulsion diffusion method for small interfering RNA delivery. *Int. J. Pharm.*

(247) Yadav, S., van Vlerken, L.E., Little, S.R. & Amiji, M.M. (2008) Evaluations of combination MDR-1 gene silencing and paclitaxel administration in biodegradable polymeric nanoparticle formulations to overcome multidrug resistance in cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*

(248) Panyam, J., Zhou, W.Z., Prabha, S., Sahoo, S.K. & Labhasetwar, V. (2002) Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J.* 16: 1217-26.

(249) Vasir, J.K. & Labhasetwar, V. (2007) Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 718-28.

(250) Prabha, S., Zhou, W.Z., Panyam, J. & Labhasetwar, V. (2002) Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 244: 105-15.

(251) Prabha, S. & Labhasetwar, V. (2004) Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression. *Pharm. Res.* 21: 354-64.

(252) Caputo, A., Sparnacci, K., Ensoli, B. & Tondelli, L. (2008) Functional polymeric nano/microparticles for surface adsorption and delivery of protein and DNA vaccines. *Curr. Drug Deliv.* 5: 230-42.

(253) Mok, H. & Park, T.G. (2008) Direct plasmid DNA encapsulation within PLGA nanospheres by single oil-in-water emulsion method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68: 105-11.

(254) Ribeiro, S., Rijpkema, S.G., Durrani, Z. & Florence, A.T. (2007) PLGA-dendron nanoparticles enhance immunogenicity but not lethal antibody production of a DNA vaccine against anthrax in mice. *Int. J. Pharm.* 331: 228-32.

(255) Mark, C. & Smales, D.C.J. (2005) Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. Humana Press.

(256) Banga, A.K. (2005) Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems CRC Press.

(257) Niazi, S. (2005) Handbook of Biogeneric Therapeutic Proteins: Regulatory, Manufacturing, Testing, and Patent Issues. Taylor & Francis.

(258) Kumar, P.S., Ramakrishna, S., Saini, T.R. & Diwan, P.V. (2006) Influence of microencapsulation method and peptide loading on formulation of poly(lactide-co-glycolide) insulin nanoparticles. *Pharmazie.* 61: 613-7.

(259) Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K. & Nagai, T. (1999) Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25: 471-6.

(260) Cui, F., Shi, K., Zhang, L., Tao, A. & Kawashima, Y. (2006) Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *J. Control Release*. 114: 242-50.

(261) Pan, Y., Xu, H., Zhao, H.Y., Wei, G. & Zheng, J.M. (2002) [Study on preparation and oral efficacy of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles]. *Yao Xue Xue Bao*. 37: 374-7.

(262) Rytting, E., Nguyen, J., Wang, X. & Kissel, T. (2008) Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv*. 5: 629-39.

(263) Yamamoto, H., Kuno, Y., Sugimoto, S., Takeuchi, H. & Kawashima, Y. (2005) Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J. Control Release*. 102: 373-81.

(264) Sanchez, A., Tobio, M., Gonzalez, L., Fabra, A. & Alonso, M.J. (2003) Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. *Eur. J. Pharm. Sci*. 18: 221-9.

(265) Son, S., Lee, W.R., Joung, Y.K., Kwon, M.H., Kim, Y.S. & Park, K.D. (2008) Optimized stability retention of a monoclonal antibody in the PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.*

(266) Reddy, M.K., Wu, L., Kou, W., Ghorpade, A. & Labhasetwar, V. (2008) Superoxide dismutase-loaded PLGA nanoparticles protect cultured human neurons under oxidative stress. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 151: 565-77.

3. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano

F. M. GOYCOOLEA[1, 2], C. REMUÑÁN-LÓPEZ [1], M. J. ALONSO [1]

[1] *Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela.*

[2] *Laboratorio de Biopolímeros. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, México.*

Los polisacáridos son los polímeros naturales más versátiles debido al amplio espectro de propiedades químicas, físicas y funcionales que confluyen en los organismos vivos, tales como conferir estructura, almacenar energía y otras funciones mucho más especializadas, tales como reconocimiento y adhesión en células eucariontes, señalización y activación de procesos de resistencia en plantas, formación de biopelículas en microorganismos, entre otras. A pesar del elevado tonelaje de polisacáridos que se utilizan como materias primas en las industrias de fibras, textil, papel y alimentos (p. ej. derivados de celulosa y almidones) hay cada vez mayor evidencia que sugiere que ciertas familias de polisacáridos poseen propiedades funcionales tales que pueden ser explotadas en otros sectores industriales especializados como el biomédico, cosmético y farmacéutico. Es especialmente relevante que algunos de estos biopolímeros combinan propiedades fisicoquímicas como la capacidad de formar sistemas tipo hidrogeles, micro y nanopartículas, con propiedades biológicas como la bio y mucoadhesividad que en su conjunto los hacen particularmente atractivos en la ingeniería y diseño de materiales empleados en ciencias de la salud.

En esta Sección se abordan las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de sistemas de nanopartículas a base de quitosano y de quitosano combinado con oligo y polisacáridos que abarcan los siguientes componentes: ciclodextrinas, alginato, ácido hialurónico y glucomanano. Desde nuestro punto de

vista, estos sistemas actualmente tienen alto potencial para el desarrollo de una nueva generación de nanopartículas coloidales poliméricas que factiblemente se convertirán en nanomedicinas innovadoras para la administración de fármacos vía transmucosa.

NANOPARTÍCULAS CONSTITUIDAS POR QUITOSANO

Generalidades sobre el quitosano

El quitosano es un aminopolisacárido obtenido a escala industrial por N-desacetilación termoalcalina de la quitina aislada de los deshechos de crustáceos. A lo largo de la década pasada el quitosano se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos y comercialmente en la manufactura de parches cicatrizantes (e.g. HemCon®). Más del 50% del número total de solicitudes de patentes registradas en 2006 que reivindican el uso de este biopolímero como una parte sustancial de la invención están relacionadas con la liberación de fármacos, ingeniería de tejidos y cicatrización de heridas (1). Actualmente estos son los nichos de mercado de mayor crecimiento en el mundo (2).

Químicamente, el término quitosano define a una familia de herteropolisacáridos lineales que están formados por 2–amino–2–deoxi–β–D–glucosa (unidades D) y 2–acetamido–2–deoxi–β–D–glucosa (unidades A) unidas en (1→4) (Figura 3.1). Las unidades de tipo A a menudo están presentes en menor proporción que las de tipo D, y su contenido, expresado como la relación molar de unidades A frente al total (A+D), se conoce como el grado de acetilación que se expresa como porcentaje (GA) o como una fracción (F_A). Junto al grado de polimerización, el GA es un parámetro fundamental que determina directamente las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano (3-5).

Además de la proporción molar neta de unidades A, su distribución en la cadena del quitosano determina las propiedades y varía con el protocolo de preparación. Muestras de quitosano homogéneamente desacetilado con F_A en el rango de 0.04-0.49, han demostrado por ^{1}H NMR que la frecuencia de distribución de diadas corresponde a un patrón aleatorio. Mientras que muestras de quitosano con el mismo rango de F_A producidas bajo condiciones heterogéneas parecen tener una distribución ligeramente más cercana a un patrón de bloque (6).

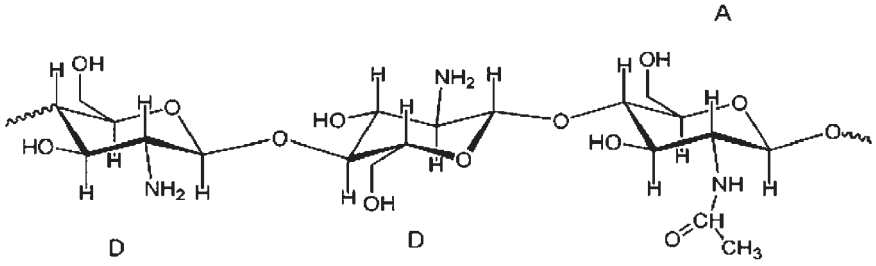


FIGURA 3.1. *Estructura esquemática representativa de una cadena de quitosano conteniendo residuos de monosacáridos 2–acetamido–2–deoxi–β–D–glucopiranosa (residuos A) y 2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranosa (residuos D), ambos unidos por enlaces β (1–4).*

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves. Además, el carácter policatiónico le confiere al quitosano alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas (p. ej. insulina, pADN, siARN, heparina, etc.) y antigénicas, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica. Las propiedades fisicoquímicas, biológicas y farmacológicas del quitosano han sido descritas en detalle en varios artículos de revisión (7-12) y en un libro editado en Español (13).

El quitosano se ha utilizado ampliamente en la industria de alimentos y está aprobado como aditivo en Japón. Se comercializa en Europa, EUA y en otros países como un atrapador de grasa en formulaciones para reducir el colesterol y el sobrepeso, se ha evaluado en ensayos clínicos como potenciador de la penetración de fármacos por vía nasal (14) y como excipiente farmacéutico (15). Una monografía para el uso biomédico de la sal de hidrocloruro de quitosano ha sido incluida en la cuarta edición de la Farmacopea Europea publicada en 2002. Se sabe que el quitosano es degradado por varias enzimas, entre ellas las quitinasas y la lisozima presente en superficies mucosas y en suero humano (16-19) así como por enzimas gástricas como la papaína, pepsina, y lipasa A (20). Otras propiedades biológicas han sido ampliamente estudiadas en el quitosano, tanto *in vitro* como en modelos animales, entre ellas cabe mencionar las siguientes: mucoadhesividad (21, 22), biocompatibilidad (17, 23), baja toxicidad (24), inmunoestimulación (25-28), capacidad para facilitar la absorción de macromoléculas biológicas a través de barreras epiteliales por la apertura transitoria de las uniones estrechas celulares (29-33). Por otra parte, a lo largo de la pasada década se ha dedicado un gran esfuerzo al estudio de las modificaciones químicas del quitosano para, de este modo, explorar su máximo potencial de aplicación. Entre los principales productos derivados, merecen especial mención

quitosano trimetilado, tiolado, N,O–carboximetilado y el injertado con polietilen glicol (PEG), los cuales exhiben propiedades mejoradas para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas (34-36). Estas modificaciones son determinantes no sólo en el patrón de solubilidad del quitosano, sino en sus propiedades biológicas y funcionales (37-40).

MÉTODOLOGÍAS Y PARÁMETROS CRÍTICOS DE PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO

Las nanopartículas a base de quitosano se forman de acuerdo a una aproximación de tipo 'bottom-up' como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. En estas nanopartículas o nanoesferas el fármaco puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida (o semi-sólida). Las metodologías más comunes mediante las cuales es posible preparar nanopartículas a base de quitosano se presentan en la Figura 3.2. A menudo, se utiliza una combinación de métodos; por ejemplo, entrecruzamiento covalente de

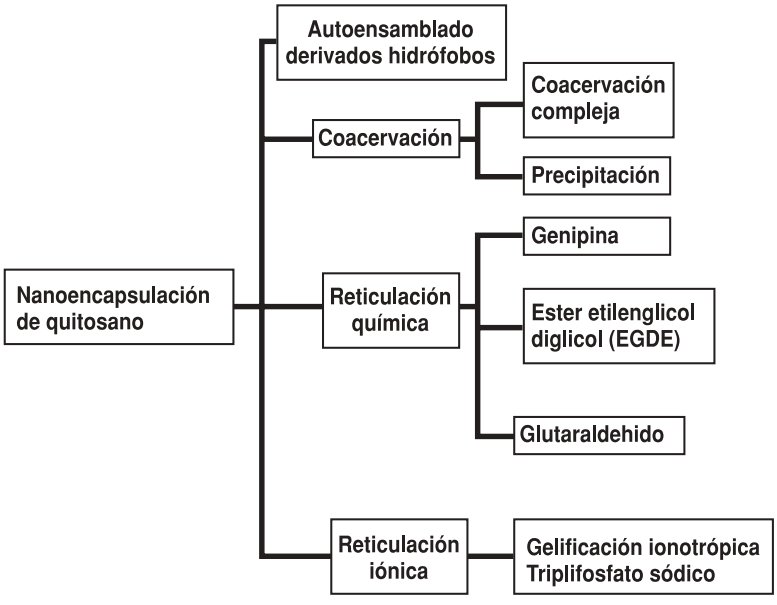


FIGURA 3.2. *Métodos para preparar nanopartículas de quitosano.*

la superficie de nanopartículas previamente obtenidas por coacervación. Es importante señalar que a pesar de la diversidad de métodos documentados y agentes químicos disponibles para obtener nanopartículas a base de quitosano, sólo unos cuantos de éstos ofrecen potencial real para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas debido al estricto marco regulatorio que deben cumplir los excipientes para la liberación de fármacos. Dentro de los que mayor atención han recibido, destacan aquellos basados fundamentalmente en el principio de la gelificación iónica del quitosano utilizando tripolifosfato pentasódico (TPP) (41).

Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en el desarrollo de plataformas para la liberación de fármacos basadas en nanopartículas de quitosano gelificado ionotrópicamente con TPP (41). Entre las ventajas de este sistema cabe destacar que evita el uso de altas temperaturas, solventes orgánicos o procesos drásticos como la sonicación, que unido a la naturaleza policatiónica del quitosano le confieren a estos sistemas la capacidad para asociar de forma eficiente y preservar la estabilidad y bioactividad de macromoléculas terapéuticas contra su degradación. Este sistema ha mostrado alta capacidad de carga de péptidos y proteínas hidrofílicas tales como insulina (42-46), albúmina sérica de bovino (47, 48) y toxoide tetánico (46). La capacidad de carga se ve principalmente afectada por la solubilidad y el pI de la proteína (46), la carga teórica de ésta (47), pH (44) y por el peso molecular del quitosano (46). Otras macromoléculas que se han cargado exitosamente en prototipos de estas nanopartículas incluyen: pDNA (49), heparina (50), β–lactoglobulina (51), y péptidos hidrofóbos como la ciclosporina A (CyA) (52,53). Moléculas pequeñas hidrófilas como glicirrizinato de amonio (fármaco antiinflamatorio) (54) también han sido asociadas a estos sistemas.

El mecanismo propuesto para la formación de nanopartículas de quitosano-TPP plantea que la gelificación ionotrópica del quitosano ocurre por interacciones electrostáticas entre productos de la disociación del TPP en solución acuosa ($P_3O_{10}^{-5}$ y $HP_3O_{10}^{-4}$), con los grupos $-NH_3^+$ del quitosano (41). El tamaño de partícula de este sistema es muy sensible al pH y la fuerza iónica (55). A su vez, el efecto de otras condiciones preparativas y de las características intrínsecas del quitosano ha sido estudiado, con atención a la composición (47, 48, 56); peso molecular y grado de acetilación del quitosano (46, 47, 57, 58). En general, el tamaño de partícula en este sistema se ha observado que varía en un rango de 100 a 350 nm; el potencial zeta entre +20 y +50 mV e invariablemente poseen una morfología esférica de acuerdo a evidencia de microscopía de transmisión electrónica y de fuerza atómica (59). Dichas características, confieren a las nanopartículas de quitosano propiedades óptimas para la interacción con diversos epitelios.

PROPIEDADES DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS Y APLICACIONES BIOFARMACÉUTICAS DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO

Habida cuenta de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, el quitosano se ha utilizado en investigación farmacéutica centrada en el desarrollo de vehículos nanoparticulares innovadores. En este sentido, son de destacar en estos sistemas tanto la capacidad para proteger macromoléculas bioactivas frente a la degradación, como la habilidad para transportarlas a través de las barreras de las mucosas. En consecuencia, su aplicación se ha enfocado al desarrollo de nanovehículos aptos para la administración por vías no invasivas, tales como las mucosas ocular, nasal y oral (60-63). Adicionalmente, estudios recientes han demostrado la factibilidad de incorporar nanopartículas de quitosano-TPP en micropartículas a base de manitol secadas por aspersión para la administración por vía del epitelio pulmonar (64). A continuación se da cuenta del potencial de estos sistemas para la administración transmucosal en sus distintas modalidades.

Administración ocular

La eficacia de nanopartículas de quitosano para prolongar la administración de fármacos a la superficie del ojo ha sido firmemente demostrada (61, 63). Esto se ha conseguido con CyA como fármaco modelo cuya administración se puede ver beneficiada de una liberación prolongada, toda vez que este fármaco se prescribe para el tratamiento del síndrome de ojo seco severo. Es interesante anotar que las nanopartículas de quitosano fueron capaces de proveer una administración selectiva y prolongada de CyA a la mucosa ocular sin comprometer tejidos internos y evitando la absorción sistémica (52). En estudios subsecuentes, utilizando quitosano marcado fluorescentemente fue posible demostrar que la adhesión de nanopartículas de quitosano a la córnea y conjuntiva persiste durante más de 24 h (65).

Administración nasal

Las nanopartículas de quitosano han demostrado mejorar el transporte y biodisponibilidad de macromoléculas terapéuticas y antigénicas a través de la mucosa nasal (66, 67). Los estudios para mejorar la eficacia de nanopartículas para la liberación de macromoléculas por vía nasal se han centrado en dos tipos de macromoléculas: insulina y antígeno de toxoide tetánico. La administración de

nanopartículas de quitosano cargadas con insulina por vía nasal en conejo conducen a una disminución significativa de los niveles de glicemia (~ 40%), con respecto a una solución de insulina y quitosano (42). En otros estudios se ha abordado la respuesta inmune posterior a la administración de nanopartículas cargadas con toxoide tetánico, empleado como un antígeno modelo (46). Paralelamente, se ha demostrado el potencial de las nanopartículas de quitosano para la administración de plásmidos por vía nasal, con resultados prometedores (68). Otros autores también han generado resultados interesantes al utilizar este sistema para la inmunización genética por vía nasal y pulmonar frente a Hepatitis B y *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente (69, 70). En general, los resultados de estudios diversos son consistentes con la hipótesis que las nanopartículas de quitosano atraviesan la mucosa nasal y alcanzan las células presentadoras de antígeno. Los mecanismos en virtud de los cuales las nanopartículas de quitosano mejoran el transporte intranasal de macromoléculas terapéuticas, se entienden como una consecuencia de la facilidad de interacción de dichas nanopartículas con el epitelio nasal.

Administración oral

Las nanopartículas de quitosano también han sido ampliamente estudiadas como vehículos para la administración oral de macromoléculas terapéuticas (43, 45, 62, 71). En este particular, la administración oral de nanopartículas de quitosano cargadas con insulina a ratas diabéticas resultó en la aparición de una respuesta hipoglucémica en un período de 8 h posterior a la administración, la cual se prolongó hasta por 24 h (43). La evidencia experimental de estos y otros estudios (45), es consistente con la hipótesis de que estos sistemas son capaces de adherirse firmemente y traspasar el epitelio intestinal, además de ceder el péptido en forma sostenida al torrente sanguíneo. Esta hipótesis ha sido corroborada por observaciones de microscopía de barrido láser confocal (CLSM) que revelaron que una porción de las nanopartículas son internalizadas en cultivos celulares monocapa tipo enterocito Caco-2 y que dicha interacción es aun más importante con células que secretan mucus, MTX-E12 (72). De aquí, que se haya sugerido que la presencia de mucus favorece la interacción de las partículas con el epitelio subyacente. Aun cuando esta interpretación no puede trasladarse directamente a la situación *in vivo*, se puede aceptar razonablemente que las nanopartículas de quitosano son capaces de conferir protección al péptido frente a la degradación y facilitan la interacción con mucosas absorbentes.

NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS A BASE DE QUITOSANO Y OTROS OLIGO Y POLISACÁRIDOS

Una nueva generación de nanopartículas ha sido desarrollada en nuestro Grupo y otros, incorporando por un lado quitosano, y por otro, oligo y polisacáridos que han incluido: ciclodextrinas, alginato, ácido hialurónico y glucomanano. La base racional para la incorporación de dichos componentes en las nanopartículas ha sido el buscar mejorar la interacción con barreras mucosas y por tanto incrementar la biodisponibilidad de macromoléculas terapéuticas al administrarlas por vía transmucosa. En esta sección abordaremos en detalle las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de los siguientes sistemas nanoparticulares híbridos: quitosano-ciclodextrinas, quitosano-alginato, quitosano-ácido hialurónico y quitosano-glucomanano.

NANOPARTÍCULAS QUITOSANO-CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos, producidos a partir de la amilosa y constituidos por 6, 7 u 8 unidades (α-, β- o γ-ciclodextrinas, respectivamente) de D–glucosa articuladas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$. Las CDs poseen una cavidad interior lipofílica y una superficie externa de naturaleza hidrofílica. Esta estructura molecular característica confiere a las CDs la capacidad para albergar en su interior a moléculas (generalmente de naturaleza hidrófoba) dando lugar a complejos de inclusión que presentan una serie de ventajas en formulaciones farmacéuticas, que incluyen: protección contra la degradación física, química y enzimática; estabilización y aumento de la solubilidad; control de la liberación; reducción de la irritación y enmascaramiento de sabores y olores desagradables (73). En el caso de macromoléculas, su tamaño e hidrofilia previenen que sean incluidas en su totalidad en el interior de la cavidad de las CDs. No obstante, se ha descrito que pueden hacerlo parcialmente por vía de interacciones de sus cadenas hidrófobas (74), siendo esta inclusión parcial suficiente para mejorar la estabilidad (75). Otras propiedades ventajosas descritas para las ciclodextrinas, incluyen la habilidad para inhibir la función de la glicoproteína-P, así como de incrementar la permeabilidad de los epitelios (74). Algunas ciclodextrinas han demostrado ser altamente efectivas como promotoras de la absorción de macromoléculas, tales como la insulina o calcitonina, a través del epitelio nasal (76) y pulmonar (77).

Otra ventaja importante a resaltar sobre las CDs es el alto grado de conocimiento existente acerca de sus propiedades farmacéuticas y toxicológicas. Las

β–CDs naturales ya han sido aprobadas en EUA como excipiente GRAS. Por otra parte, mediante modificación química, las CDs naturales son sustituidas en los grupos hidroxilos con grupos metilo, hidroxipropil, carmoximetil o sulfobutil éster, de forma que se han obtenido derivados aniónicos más hidrosolubles e incluso con mejores perfiles de toxicidad que las ciclodextrinas sin modificar. En la actualidad se comercializan varios derivados de CDs en diferentes formulaciones y para distintas vías de administración (78).

Habida cuenta de las ya mencionadas ventajas que exhiben las CDs por sí mismas como excipientes farmacéuticos, éstas han sido incorporadas en partículas nanométricas como una estrategia para diseñar sistemas de liberación versátiles capaces de encapsular fármacos con diferentes propiedades fisicoquímicas. El abordaje más común en este sentido, ha consistido en la incorporación de complejos de inclusión fármaco-CD previamente formados en nanopartículas poliméricas. La presencia de CDs en estos sistemas resulta generalmente en un incremento de la carga de fármaco (79, 80).

Por otra parte, nuestro grupo ha sido pionero en demostrar la factibilidad tecnológica de formar nanopartículas híbridas compuestas a base de quitosano con derivados de ciclodextrinas: hidroxipropil-β-ciclodextrina, carboximetil-β-ciclodextrina y sulfobutil éter-β-ciclodextrina (50, 81-84). Esta estrategia ofrece la ventaja de combinar las propiedades de conferir solubilidad, estabilidad y permeabilidad de las ciclodextrinas con aquellas mucoadhesivas y también permeabilizantes del quitosano, para devenir en un tipo de nanovehículo de liberación de fármacos con características únicas.

Las nanopartículas de quitosano-CD pueden prepararse utilizando la técnica basada en el concepto de gelificación ionotrópica aplicado al quitosano (41). Brevemente, estos sistemas se forman debido al ensamblado en forma de estructuras nanométricas del quitosano al interactuar con un agente reticulante. Dicho agente reticulante puede ser, o bien TPP o la propia CD (82), en dependencia de la carga eléctrica de la CD elegida. En el caso de CD con bajo grado de sustitución por grupos aniónicos, se precisa del uso de TPP para promover la gelificación del quitosano. En contraste, la incorporación de CD con un elevado grado de sustitución con grupos aniónicos está mediada por la interacción electrostática con el quitosano y las CDs por sí mismas pueden actuar como agentes reticulantes.

Tal como sucede con las nanopartículas compuestas únicamente por quitosano, el tamaño de aquellas que incorporan CD varía en dependencia de los parámetros de formulación, tales como el grado de acetilación y peso molecular

del quitosano y la relación de masa entre el quitosano y la CD. En general, la incorporación de CD tiene un efecto moderado sobre las características físicas de las nanopartículas resultantes cuyos valores de tamaño y potencial zeta fluctúan en un rango entre 275 y 550 nm y son cercanos a +35 mV, respectivamente (82). La inclusión de CDs neutras conlleva a una leve disminución del potencial zeta de la nanopartícula, un efecto que se atribuye a la presencia de CD en la superficie (81). Lógicamente, en el caso de nanopartículas que contienen CDs aniónicas, la reducción del potencial zeta es más pronunciada (82). Mediante uso de macroanálisis elemental ha sido posible concluir que la carga electrostática de la CD es el principal factor que determina la composición de nanopartículas de quitosano-CD. En el caso de CDs neutras, la incorporación en la matriz alcanza hasta un 20%, en tanto que para aquellas que contienen CDs aniónicas éstas pueden representar hasta un 60% de la composición final (82).

Las nanopartículas de quitosano-CD han sido evaluadas en su habilidad para cargar fármacos con propiedades fisicoquímicas diversas incluyendo tanto sustancias de muy baja solubilidad como macromoléculas. Por ejemplo, fármacos altamente hidrófobos como el triclosan y la furosemida pueden incorporarse satisfactoriamente en este tipo de nanopartículas gracias a su inclusión previa en la cavidad de la CD (81). En estudios posteriores, se ha demostrado que las nanopartículas de quitosano-CD son aptas para cargar muy eficientemente diversos tipos de macromoléculas terapéuticas tales como heparina (50), insulina (84) y pDNA (83). Por tanto, esta nueva clase de nanopartículas híbridas ofrece ventajas específicas cuando se compara con las nanoparículas formadas únicamente por quitosano.

Propiedades de liberación de fármacos y aplicaciones biofarmacéuticas de nanopartículas de quitosano-ciclodextrinas

El potencial de las nanopartículas de quitosano-CD como vehículos para la administración de macromoléculas terapéuticas a través de mucosas ha sido investigado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (83, 84). Por un lado, se han llevado a cabo estudios en cultivos celulares Calu-3 (83), como modelo que simula adecuadamente las características del epitelio respiratorio (nasal y tráqueobronquial) (85). Por otra parte, se ha estudiado la capacidad de este sistema para el transporte de insulina a través de la mucosa nasal (84).

Los estudios *in vitro* en células Calu-3 han abarcado los siguientes aspectos: pruebas de citotoxicidad en células en proliferación; estudios sobre la modulación de la barrera intercelular en células diferenciadas, para lo cual se

monitorizaron los cambios en la resistencia transepitelial (TEER); estudios de internalización por CLSM y estudios de transfección con pSEAP (plásmido modelo que codifica la expresión de fosfatasa alcalina secretada).

Los resultados obtenidos en células Calu-3 revelaron que las nanopartículas que contienen CD en su composición resultaron ser menos tóxicas en un amplio rango de dosis, lo que ha sido atribuido al excelente perfil de biocompatibilidad de las CDs (78). Concretamente, los valores de IC_{50} fueron aproximadamente 3 veces mayores para estas partículas que para las formulaciones que contenían únicamente quitosano (83). A su vez, las células en estado diferenciado fueron expuestas a distintas dosis de nanopartículas y los valores de TEER medidos a distintos tiempos por un período de hasta 2 h y una vez retiradas las muestras, se continuaron monitorizaron hasta 12 h. Mientras que los tratamientos control (tampón HBSS pH 6.4 y 7.4) no produjeron cambios, las nanopartículas de quitosano-CD redujeron la TEER bajo un efecto dosis-dependiente y saturable. Estos resultados han sido atribuidos principalmente a la apertura de las uniones estrechas intercelulares, lo cual supone un aumento de la permeabilidad del epitelio al paso de moléculas por vía paracelular y pone de manifiesto el potencial de estos sistemas como promotores de la absorción de fármacos. En todos los casos se observó un efecto completamente reversible en la TEER una vez que se retiraron los tratamientos, diagnóstico de que las células permanecieron funcionalmente intactas.

Por su parte, se estudió el potencial de las nanopartículas quitosano-CD como vehículos sintéticos de ADN (83). Primeramente se utilizó microscopía CLSM a fin de evaluar la interacción de las partículas con células Calu-3 diferenciadas. Se utilizaron nanopartículas preparadas con quitosano marcado con fluoresceína, en tanto que para la precisa localización de los sistemas, se utilizó un segundo marcador del núcleo celular, el yoduro de propidio. Los resultados permitieron demostrar que las nanopartículas penetran en forma eficiente en las células y se distribuyen en forma homogénea en el medio intracelular independientemente de su composición. Esto permitió anticipar que el ADN una vez encapsulado en las nanopartículas, podría penetrar en forma eficiente al interior de las células. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios de transfección en el mismo modelo celular, utilizando el plásmido pSEAP, cuya expresión celular permite la posibilidad de cuantificar la proteína secretada al medio de cultivo mediante una técnica no destructiva. Los resultados revelaron que todas las formulaciones de nanopartículas ensayadas dieron lugar a un mayor nivel de expresión proteica que cuando se aplicó el plásmido en forma libre. En general, los mayores niveles de expresión se observaron para nanopartículas preparadas

con quitosano de bajo peso molecular, independientemente del tipo de CD. Los resultados fueron concordantes con aquellos obtenidos en diversos estudios realizados con nanopartículas de quitosano y quitosano-ácido hialurónico y complejos de quitosano-pADN, en los cuales, las mayores eficacias de transfección encontradas para los sistemas con quitosano de bajo peso molecular se atribuyeron a una más fácil y rápida liberación intracelular del plásmido (86, 87).

Los estudios *in vivo* consistieron en la administración nasal a conejos de las formulaciones de nanopartículas de quitosano-CD conteniendo insulina, así como de un control constituido por el péptido en solución (84). Los resultados obtenidos mostraron que las nanopartículas produjeron un descenso máximo de los niveles de glucosa plasmática equivalente a un 35% del valor basal, frente a sólo un 14% producido por la administración de una dosis idéntica de insulina en solución (5 UI/kg). No se apreciaron diferencias entre el efecto hipoglucémico inducido por los diferentes sistemas (quitosano-CM-β-CD y quitosano SBE-β-CD) y la efectividad no se vio influenciada por la cantidad de quitosano ni CD presente en la formulación. En base a estos resultados, se han sugerido dos mecanismos por los que los sistemas de nanopartículas quitosano-CD son capaces de incrementar la absorción sistémica de insulina. Por un lado, las nanopartículas se adhieren al epitelio nasal, donde gracias a sus componentes (quitosano y CD), actúan como promotores de la absorción mediante la apertura de las uniones estrechas intercelulares y, simultáneamente, liberan la insulina, que a su vez ve facilitado su paso por vía paracelular. Y por otro lado, tal vez en modo minoritario, las nanopartículas pueden ser internalizadas y atravesar el epitelio nasal por vía transcelular, actuando como verdaderos nanovehículos de macromoléculas.

NANOPARTÍCULAS QUITOSANO-ALGINATO

El alginato es otro polisacárido obtenido principalmente a partir de algas marinas marrones y que ha atraído especial interés en el campo biomédico a lo largo de la última década (88). Químicamente, es un co-polímero constituido por poli-D–manuronato (poli-M) y poly-L-guluronato (poli-G) homopoliméricos y por bloques donde ambos residuos ocurren alternadamente. La composición de la cadena de alginato, resumida en el valor de la relación de la fracción molar de residuos de D-manuronato a L-guluronato (ratio M/G) es determinante en las propiedades fisicoquímicas y funcionales del alginato. Destaca en este sentido, la capacidad de gelificar en presencia de cationes bivalentes específicos (Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}) como consecuencia de la interacción cooperativa tipo ‘caja

FIGURA 3.3. *Representación esquemática de tres distintos tipos de nanopartículas a base de quitosano y alginato: a) Nanomatriz pre-gelificada de alginato por reticulación ionotrópica con cloruro cálcico recubierta con quitosano; b) Nanomatriz de quitosano preparada por coavervación con sulfato de sodio recubierta con alginato; c) Nanomatriz híbrida co-gelificada por gelificación ionotrópica de quitosano con tripolifosfato pentasódico (TPP) y complejación concomitante del alginato. Reproducida con permiso de Woodhead Pub. Ltd.*

de huevos' ('*egg-box*' en Inglés) entre bloques de poli-G de longitud más de 6-10 residuos, en virtud de la cual dos grupos carboxilato forman un complejo de coordinación con el catión (89). Con base a esta capacidad de formar hidrogeles y de la demostrada biocompatibilidad del alginato, se ha utilizado ampliamente en el diseño e ingeniería de biomateriales (90). Adicionalmente, desde hace casi cuatro décadas se le han atribuido al alginato propiedades bioadhesivas (91, 92). Sin embargo, sólo recientemente dichas propiedades se han explotado en formulaciones para el tratamiento de desórdenes del tracto esofágico superior como el reflujo (93), que son condicionantes del síndrome de Barret, el cual a su vez es precursor del adenocarcinoma de esófago (94).

Dado que las propiedades fisicoquímicas y biológicas del alginato en cierta medida son complementarias a las del quitosano, se ha investigado el desarrollo de sistemas nanoparticulares a base de ambos polisacáridos. Se han descrito al menos tres distintas estrategias metodológicas para preparar nanopartículas de este tipo (95), mismas que se representan esquemáticamente en la Figura 3.3 y discuten en detalle a continuación.

Nanopartículas de alginato pre-gelificado recubiertas con quitosano

Un proceso consistente en dos etapas ha sido descrito en virtud del cual el alginato es pre-gelificado en presencia de cloruro cálcico bajo sonicación para obtener un nanogel el cual es posteriormente recubierto con quitosano (96) (Figura 3.3a).

Las partículas así obtenidas presentan un tamaño medio de 650 ± 22 nm siempre y cuando se mantenga controlada la relación de masas de cloruro de calcio/alginato en el rango de 0.08 a 0.35 y a una relación de quitosano a alginato de 0.1. El papel de los principales parámetros que determinan las características de este sistema ha sido estudiado (97). En general, el uso de polímeros de bajo peso molecular conduce a partículas de menor tamaño (~ 338-415 nm) independientemente de la relación de masa alginato/quitosano.

Nanopartículas de quitosano coacervado recubiertas con alginato

Un segundo protocolo de preparación consistente en tres etapas ha sido descrito para la preparación de nanopartículas cargadas con proteína y optimizado como una plataforma para la cesión de antígenos (98). Para este propósito, nanopartículas de quitosano son inicialmente pre-formadas al mezclar una solución de sulfato sódico en una de quitosano en presencia de un surfactante (Tween 80®) bajo agitación suave y sonicación. Las partículas aisladas fueron liofilizadas y resuspendidas en un tampón de fosfato (pH 7.4) e incubadas en disoluciones de ovoalbúmina de concentración variable. Posteriormente, la suspensión coloidal fue añadida sobre soluciones de alginato de concentración variable para finalmente reticular la recubierta de alginato con cloruro cálcico. Este protocolo conduce a la obtención de nanopartículas de tamaño en el rango de 100 a 1000 nm con potencial zeta marcadamente negativo (~ -35 mV) y la eficacia de asociación de ovoalbúmina fue de 40%. La recubierta de alginato se encontró que confiere estabilidad a las nanopartículas en fluido intestinal simulado (pH 6.8) a 37 °C y en consecuencia se previene la liberación tipo 'burst' de la ovoalbúmina.

Nanopartículas co-gelificadas híbridas de quitosano-alginato

Recientemente hemos descrito un nuevo tipo de sistema nanoparticulado híbrido formado en una sola etapa por la gelificación ionotrópica del quitosano con TPP concomitante a la complejación con alginato (99). Para ello, se utilizó alginato con pesos moleculares en el rango 4 a 32 kDa y una relación de masa alginato/quitosano de 0.1:1. El tamaño de las nanopartículas obtenidas estuvo en un rango de 247 - 359 nm, tuvieron una polidispersión relativamente elevada (PI < 0.36) y un potencial zeta de + 43.1 ± 4.0 mV. Estas nanopartículas permanecen estables en tampón acetato (pH 4.3) a 37 °C durante ~20 min, independientemente del peso molecular del alginato.

Propiedades de liberación de fármacos y aplicaciones biofarmacéuticas de nanopartículas de quitosano-alginato

El sistema de nanopartículas de alginato pre-gelificadas ionotrópicamente y recubiertas con quitosano ha sido aplicado para la administración oral de insulina (100), consiguiendo más de un 70% de eficacia de asociación. Los resultados obtenidos permitieron demostrar que la difusión de insulina se ve retardada por el complejo formado entre quitosano y alginato. Adicionalmente, la estructura secundaria de la insulina atrapada en la matriz de este sistema se conserva durante el proceso de preparación y liberación (101). Estudios hechos en rata diabética revelaron que la administración oral estas partículas consigue reducir en un 40% los niveles de glucosa en plasma con respecto a los valores basales con dosis de 50-100 UI/kg y mantienen la hipoglucemia durante un período superior a 18 h (100).

A su vez, nanopartículas co-gelificadas de quitosano-TPP con alginato han sido evaluadas como vehículos para la administración nasal de insulina en conejos. Los resultados mostraron que estas nanopartículas fueron capaces de facilitar el transporte de insulina a través de la mucosa nasal, y de promover una absorción significativa (equivalente a una reducción de 40% de los niveles plasmáticos de glucosa) durante un período que se prolongó durante varias horas (99).

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO-ÁCIDO HIALURÓNICO

Junto con el quitosano y el alginato, el ácido hialurónico (también llamado hialuronán) es el otro polisacárido principal que se ha considerado como base para el desarrollo de aplicaciones biomédicas. El ácido hialurónico es un aminopolisacárido que existe en la matriz extracelular de los tejidos conectivos de animales vertebrados. El ácido hialurónico tradicionalmente se extrae del humor vítreo de bovinos, de la cresta de gallos o de cordones umbilicales. El mismo polisacárido se produce actualmente a gran escala a partir de las bacterias *Streptococcus zooepidermicus* y *Streptococcus equi*, con lo cual el precio ha disminuido notablemente y por tanto el número de aplicaciones ha ido en aumento (102). La estructura química del ácido hialurónico se define como un heteropolisacárido lineal copolimérico tipo AB constituido por unidades de ácido D-glucurónico unidas por enlaces β(1—>4) y por residuos 2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucosa enlazadas de acuerdo a un patrón β(1—>3). El ácido hialurónico se considera no sólo un excipiente farmacéutico sino un fármaco. Su biocompati-

bilidad y propiedades viscoelásticas son la base de su utilización en oftalmología, dermatología y en el tratamiento de la osteoartritis. Desde un punto de vista biofarmacéutico, el principal interés se ha centrado en sus propiedades bio y mucoadhesivas, particularmente debido a los receptores celulares CD44 hacia este polisacárido que ocurren en las barreras biológicas (103, 104).

El quitosano y el ácido hialurónico han sido asociados conjuntamente en nanopartículas híbridas co-gelificadas con el propósito de mejorar las propiedades para el transporte de macromoléculas (105). Esto se ha conseguido por el proceso de gelificación ionotrópica del quitosano descrito anteriormente para sistema quitosano-alginato. Este tipo de nanopartículas se forman por el mezclado simple de una disolución acuosa de quitosano con otra de ácido hialurónico en presencia de TPP. La incorporación de ácido hialurónico ha sido demostrada por medio de electroforesis en gel de agarosa y la estabilidad al ser incubadas en fluido lacrimal simulado fue estudiada durante un período de 24 h. Las nanopartículas se forman a una relación de masa de ácido hialurónico/quitosano en el rango de 0.1:1.0 a 1:1. Ambas concentraciones, la de ácido hialurónico y la de TPP, afectan directamente al tamaño de partícula. Estas nanopartículas, al igual que las co-gelificadas a base de quitosano-alginato, presentan un potencial zeta positivo que fluctúa en el rango ~ + 30 - ~ + 40 mV. En general, el aumento en la cantidad de ácido hialurónico conduce a una reducción en los valores de potencial zeta, lo que ha sido interpretado como la consecuencia esperada de la localización preferente de las cadenas de ácido hialurónico sobre la superficie de las nanopartículas.

Propiedades de liberación de fármacos y aplicaciones biofarmacéuticas de nanopartículas de quitosano-ácido hialurónico

Nanopartículas a base de quitosano-ácido hialurónico se han cargado con albúmina de suero de bovino (ASB), insulina, péptidos hidrofóbicos tales como la CyA y con plásmido que codifica la expresión de proteína fluorescente verde (pEGFP-C1). En todos los casos, la eficacia de asociación es muy alta (~ 90%) y muy similar a la evaluada en nanopartículas a base de quitosano sólo. En el caso de la eficacia de asociación de ASB, se ha encontrado que la presencia de ácido hialurónico no presenta influencia sobre este parámetro. Esto ha sido explicado con base a la interacción entre ASB y el ácido hialurónico mediada por asociación hidrófoba, puentes de H y otras fuerzas intermoleculares (106). Por su parte, la CyA también ha sido incorporada en este sistema, como modelo de polipéptido notablemente hidrófobo, carga eléctrica neutra, carácter

lipofílico y que es ampliamente utilizado en terapia y como agente inmunosupresor. Esto se hizo teniendo en cuenta estudios previos en los cuales se demostró que la co-administración intravenosa de CyA y ácido hialurónico conlleva a un aumento de cuatro veces en el efecto inmunosupresor del péptido (107), un efecto atribuido a la interacción del ácido hialurónico con el receptor CD44 antes mencionada. Por su parte, la utilidad del sistema quitosano-ácido hialurónico para mejorar la biodisponibilidad de CyA posterior a la administración por vía oral (53) y ocular (52) ha sido demostrada. Las ventajas biofarmacéuticas de las nanopartículas a base de quitosano y ácido hialurónico, le hacen un excelente candidato para la liberación de macromoléculas terapéuticas por vía transmucosa.

Estudios llevados a cabo por nuestro grupo han buscado desarrollar nanovehículos innovadores a base de quitosano-ácido hialurónico para la liberación de genes (108). Para este fin, se han obtenido nanopartículas cargadas con ADN plasmídico utilizado quitosano de peso molecular ~ 10-12 ó ~ 125 kDa y ácido hialurónico de peso molecular < 10 ó ~ 170 kDa. Estas partículas se han formulado por gelificación ionotrópica del quitosano con TPP y complejación concomitante del ácido hialurónico con quitosano. La biocompatibilidad, internalización celular y eficacia de transfección de estas nanopartículas así como los posibles mecanismos subyacentes han sido estudiados tanto en la línea celular HEK293 (108), en un modelo de epitelio de córnea humano, como en epitelio ocular de conejo (87). Para ello, se han asociado al plásmido pEGFP-C1 y a otro que codifica la expresión de beta galactosidasa (pβ-Gal). En ambos casos, más del 86% del pDNA se mantiene asociado a las diversas formulaciones de acuerdo a ensayos de electroforesis en gel. La incubación de las nanopartículas cargadas con pADN con quitosanasa y hialuronidasa, permitió comprobar que este sistema preserva intactas la conformación y bioactividad de ambos plásmidos.

En lo que a las propiedades biofarmacéuticas de este sistema se refiere, vale la pena resaltar su baja citotoxicidad independientemente del peso molecular de los polisacáridos. Aun a dosis de nanopartículas de 154 mg/cm^2 la viabilidad celular se mantuvo por encima de 80%. Esto representa una mejora substancial sobre las nanopartículas a base de quitosano únicamente (18-36 mg/cm^2) en la misma línea celular. La disminución en citotoxicidad se ha atribuido a la presencia de ácido hialurónico, debido a su elevada biocompatibilidad e implicación en procesos biológicos tales como adhesión celular y proliferación, entre otros. La eficacia de transfección, según lo revelaron observaciones por microscopía CLSM, fue alta y

mostró diferencias asociadas al peso molecular del quitosano, mientras que a tiempos más prolongados no se observan diferencias significativas asociadas al peso molecular del quitosano. El efecto del quitosano de bajo peso molecular ha sido atribuido la liberación del pADN de las nanopartículas. En tanto que quitosano de alto peso molecular exhibe mayor afinidad por el ADN y por tanto, la disociación del complejo se ve menos favorecida que en el caso de oligómeros de quitosano, una consecuencia del carácter cooperativo de la unión entre los polielectrolitos quitosano y ADN (86). Otra conclusión de los estudios de eficacia de transfección en este sistema de nanopartículas fue que el número total de células expresan la proteína fluorescente verde aumenta con la cantidad de ácido hialurónico presente. Observaciones de microscopía CLSM de la internalización y distribución intracelular llevados a cabo con pβ-Gal marcado fluorescentemente revelaron que las células expuestas a las nanopartículas tuvieron una fluorescencia verde intensa, resultado de la presencia de pADN distribuido en el citoplasma. Para esta respuesta no se observaron diferencias entre las distintas formulaciones, un resultado que se puede considerar diagnóstico de que la internalización celular no es un factor limitante en la eficacia de transfección. No obstante, observaciones después de 15 h revelaron la presencia de manchas verdes asociadas a la presencia del plásmido en el citoplasma y el núcleo. En general, los patrones observados permitieron concluir que el tráfico intracelular, y por tanto el acceso del pADN al núcleo, sí son dependientes de la composición de la nanopartícula. Los ensayos de eficacia de transfección *in vivo* llevados a cabo con este sistema, han mostrado que es efectivo para transfectar células de córnea y conjuntiva después de la administración tópica en conejos (87).

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO-GLUCOMANANO

Otro polisacárido que se ha identificado con propiedades muy atractivas para la formulación de nanopartículas a base de quitosano es el glucomanano de konyac (*Amorphophalus konjac*), un tubérculo comestible en Asia. El uso de este polisacárido está aprobado en alimentos y medicamentos en Europa, EUA y Asia. En contraste con quitosano, alginato y ácido hialurónico que contienen grupos con carga eléctrica en su estructura, el glucomanano natural es un polisacárido neutro, aunque también está disponible comercialmente el derivado fosforilado. La principal propiedad biofarmacéutica que da cuenta del potencial del glucomanano en el desarrollo de sistemas nanoparticulares para liberación de fármacos es su alto contenido de D-manosa, que le confiere la

capacidad para interactuar con superficies biológicas que contienen receptores de manosa, tales como las células M de las placas de Peyer (109, 110) y los macrófagos (111).

Las nanopartículas de quitosano-glucomanano se pueden formar ya sea en presencia o en ausencia de TPP, y con glucomanano nativo neutro o el derivado fosforilado (112, 113). Ha sido posible también preparar nanopartículas de quitosano-TPP recubiertas con el glucomanano derivatizado. En general, estas nanopartículas ofrecen varias ventajas tecnológicas, que incluyen poder ser liofilizadas en ausencia de agentes crioprotectantes así como presentar mayor estabilidad en medios de alta fuerza iónica similares a los encontrados en condiciones fisiológicas (tampón PBS pH 7.4) que las nanopartículas de quitosano-TPP (112).

Las nanopartículas a base de quitosano y glucomanano fueron concebidas con la idea de optimizar el comportamiento de las nanopartículas de quitosano-TPP al potenciar la absorción de insulina administrada por la vía oral. Para ello se evaluó la eficacia de este sistema en ratas normoglucémicas. La presencia del glucomanano en la nanoestructura fue crítica para obtener una reducción de 50% en los niveles séricos de glucosa. Fue además interesante que la respuesta hipoglucémica apareció 14 h posterior a la administración y se mantuvo durante un período de > 10 h. El papel del glucomanano en potenciar la interacción de las nanopartículas con el epitelio intestinal ha sido investigado en estudios subsecuentes in vitro utilizando un co-cultivo de células Caco-2 y Raji como modelo de células M. Estos estudios revelaron que la presencia de glucomanano potencia drásticamente la captura de nanopartículas por las células M con respecto a las nanopartículas de quitosano (114).

CONCLUSIONES

A través de este capítulo, hemos buscado presentar una visión de los distintos sistemas nanoparticulares a base de quitosano y otros oligo y polisacáridos abarcando tanto aspectos fundamentales como sus aplicaciones en liberación de fármacos y biofarmacéuticas. Sin duda, esta clase de nanomateriales son especialmente interesantes para la administración de macromoléculas terapéuticas por vía transmucosal. Actualmente se llevan a cabo estudios toxicológicos y mecanísticos que serán la base para que su aplicación comercial se vea materializada en un futuro. Sistemas de nanopartículas híbridas tales como los que se han abordado en este trabajo, con propiedades y funcionalidad mejoradas, continuarán ampliando el

rango de estrategias para conseguir llegar a tejidos de mucosa diana, así como para reducir la cantidad de quitosano necesaria para obtener el efecto deseado.

A mediano plazo, es de esperar que sistemas nanoscópicos avanzados de liberación de fármacos a base de quitosano co-gelificado con otros polisacáridos, sean la base de nanomedicinas innovadoras relacionadas con estructuras tipo «capa-por-capa», sistemas sensibles a estímulos biológicos y aquellos modificados en la superficie obtenidos por vía de la conjugación con otras especies no sintéticas capaces de llegar a receptores celulares específicos (p. ej. azúcares, enzimas, anticuerpos, lectinas, ácido fólico), tanto para la liberación dirigida de fármacos como para terapia de cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Higuera-Ciapara, I., Toledo-Guillén, A.R. & Goycoolea F.M. (2007) Tendencias en propiedad intelectual y orientación de mercado para la quitina y quitosano. En: Argüelles-Monal W M, Campana S and Mada A, Proceedings of the IV Iberoamerican Chitin Symposium. Iberoamerican Chitin Society, Natal, Brasil.

(2) Orive, G., Carcaboso, A.M., Hernández, R.M., Gascón, A.R. & Pedraz J.L. (2005) Biocompatibility evaluation of different alginates and alginate-based microcapsules. *Biomacromolecules*. 6:927-931.

(3) Schipper N.G.M., Vårum K.M., Artursson P. (1996). Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. I. Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. Pharm. Res. 13: 1686-1692.

(4) Prasitsilp, M., Jenwithisuk, R., Kongsuwan, K., Damrongchai, N. & Watts. P. (2000). Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. *J. Mater. Sci.-Mater. M*. 11: 773-778.

(5) Huang. M., Khor. E. &, Lim. L.Y. (2004) Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm. Res*. 21: 344-353.

(6) Vårum, K.M., Anthonsen, M.W., Grasdalen, H. & Smidsrød, O. (1991). Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by highfield n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr. Res*. 211: 17-23.

(7) Skaugrud, O., Hagen, A., Borgersen, B. & Dornish, M. (1999). Biomedical and pharmaceutical applications of alginate and chitosan. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev*. 16: 23-40.

(8) Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N. & Aminabhavi, T.M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Rel.* 100: 5-28.

(9) Ravi Kumar, M.N.V., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H. & Domb, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev*. 104: 6017-6084.

(10) George, M. & Abraham, T.E. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan-a review. *J. Control Rel*. 114: 1-14.

(11) Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci*. 31: 603-632.

(12) Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym. Int*. 57:3 97-430.

(13) Pastor, A. (2004) Quitina y Quitosano. Obtención, Caracterización y Aplicaciones. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Lima, Perú.

(14) Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A. N. & Davis, S.S. (2001). *Adv. Drug Deliv. Rev*. 51: 81-96.

(15) Singla, A.K. & Chawla, M. (2001) Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *J. Pharm. Pharmacol*. 53(8): 1047-1067.

(16) Pangburn, S.H., Trescony, P.V. & Heller, J. (1982) Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials*. 3: 105-108.

(17) Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y. & Nonaka, I. (1990) Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration. En: Gebelein G. G. y Dunn R.L. Progress in Biomedical Polymers. Nueva York, Plenum Press, 283-289.

(18) Aiba, S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosan. *Int. J. Biol. Macromol*. 14: 225-228.

(19) Nordtveit, R.J., Våurn, K.M. & Smidsrød, O. (1996). Degradation of partially N-acetylated chitosan with hen egg white and human lysozyme. *Carbohydr. Polvm*. 29: 163-167.

(20) Roncal, T., Oviedo, A., López de Armentia, I., Fernández L. & Villarán, M.C. (2007) High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. *Carbohydr. Res*. 342: 2750-2756.

(21) Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Schacht, E.H. & Junginger, H.E. (1992). In-vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int. J. Pharm*. 78: 43-48.

(22) Shruti, C., Saiqa, M., Jasjeet, K., Zeemat, I. & Sushma, T. (2006). Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol*. 58: 1021-1032.

(23) Vandevord, P.J., Matthew, H.W.T., Desilva, S.P., Mayton, L., Wu, B. & Wooley, P.H. (2002) Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J. Biomed. Mat. Res*. 59(3): 585-590.

(24) Aspden, T.J., Mason, J.D. & Jones, N.S. (1997) Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on *in vitro* and *in vivo* mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J. Pharm. Sci*. 86: 509-513.

(25) Peluso, G., Petillo, O., Ranieri, M., Santin, M., Ambrosia, L., Calabró, D., Avallone, B. & Balsamo, G (1994). Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials*. 15: 1215-1220.

(26) Porporatto, C., Bianco, I.D. & Correa, S.G. (2005) Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. J. *Leukocyte Biol*. 78: 62-69.

(27) Borges O., Borchard, G., De Sousa, A., Junginger, H.E. & Cordeiro-da-Silva, A. (2007) Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers. *Int. J. Pharm*. 337: 254-264.

(28) Zaharoff, D.A., Rogers, C.J., Hance, K.W., Schlom, J. & Greiner, J.W. (2007) Chitosan solution enhances the immunoadjuvant properties of GM-CSF. *Vaccine*. 25: 8673-8686.

(29) Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S.S. & Illum, L. (1994) Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res*. 11: 1358-1361.

(30) Kotze, A.F., De Leeuw, B.J. & Luessen, H.L. (1997) Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across the intestinal epithelium: In vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm*. 159: 243-253.

(31) Schipper, N.G.M., Olsson, S., Hoostraate, A.J., De Boer, A.G., Vårum, K.M. & Artursson, P. (1997) Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res*. 14: 923-929.

(32) Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J.X. & Kissel, T. (2000) Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 50: 147-60.

(33) Smith, J., Wood, E. & Dornish, M. (2004) Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharm. Res*. 21: 43-49.

(34) van der Merwe, S. M., Verhoef, J. C., Verheijden, J. H. M., Kotze, A. F. & Junginger, H. E. (2004) *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 58: 225-235.

(35) Bernkop-Schnürch, A., Guggi, D. & Pinter, Y. (2004). Thiolated chitosans: development and in vitro evaluation of a mucoadhesive, permeation enhancing oral drug delivery system. *J. Control. Release*. 94: 177-86.

(36) Saito, H., Wu, X., Harris, J. M. & Hoffman, A. S. (1997) Graft copolymers of poly(ethy1ene glycol) (PEG) and chitosan. *Macromol. Rapid Commun*. 18: 547-50.

(37) Kotze, A. F., Lueßen, H. L., de Leeuw, B. J., de Boer, A. G., Verhoef, J. C. & Junginger, H. E. (1998). Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *J. Control. Release*. 51: 35-46.

(38) Thanou, M., Verhoef, J. C., Verheijden, J. H. M. & Junginger, H. E. (2001). Intestinal Absorption of Octreotide Using Trimethyl Chitosan Chloride: Studies in Pigs. *Pharm. Res*. 18: 823-828.

(39) Bernkop-Schnürch, A., Hornof M. & Guggi, D. (2004). Thiolated chitosans. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 57: 9-17.

(40) Krauland, A.H., Guggi, D. & Bernkop-Schnürch, A. (2004) Oral insulin delivery: the potential of thiolated chitosan-insulin tablets on non-diabetic rats. *J. Control. Release*. 95: 547-555.

(41) Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (1997) Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci*. 63: 125-132.

(42) Fernández-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res*. 16: 1576-1581.

(43) Pan, Y., Li, Y., Zhao, H., Zheng, J., Xu, H., Wei, G., Hao, J. & Cui, F. (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm*. 249: 139-147.

(44) Ma, Z., Yeoh, H.H. & Lim, L.Y. (2002) Formulation pH modulates the interaction of insulin with chitosan nanoparticles. *J. Pharm. Sci*. 91: 1396-1404.

(45) Ma, Z., Lim, T.M. & Lim, L.Y. (2005) Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. *Int. J. Pharm*. 293: 271-280.

(46) Vila, A., Sánchez, A., Janes, K.A., Behrens, I., Kissel, T., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (2004). Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 57: 123-131.

(47) Xu, Y. & Du, Y. (2003) Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm*. 250: 215-226.

(48) Zhang, H., Oh, M., Allen, C. & Kumacheva, E. (2004) Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. *Biomacromolecules*. 5: 2461-2468.

(49) Mao, H.Q., Roy, K., Troung-Le, V.L., Janes, K.A., Lin, K.Y., Wang, Y., August, J.T. & Leong, K.W. (2001) Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. Control Rel.* 70: 399-421.

(50) Krauland, A.H. & Alonso, M.J. (2007) Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 340: 134-142.

(51) Chen, L. & Subirade, M. (2005) Chitosan/β-lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. *Biomaterials*. 26: 6041-53.

(52) De Campos, A.M., Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2001) Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporine A. *Int. J. Pharm.* 224: 159-158.

(53) El-Shabouri, M. H. (2002) Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *Int. J. Pharm.* 249: 101-108.

(54) Wu, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J. & Fu, S. (2005) Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* 295: 235-245.

(55) López-León, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L. & Bastos-González, D. (2005) Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J. Colloid Interf. Sci.* 283: 344-351.

(56) Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C. & McCarron, P. (2005) Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloid Surface B*. 44: 65-73.

(57) Janes, K.A. & Alonso, M.J. (2003) Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization. *J. Appl. Polym. Sci*. 88: 2769-2776.

(58) Goycoolea, F.M., El Gueddari, N.E., Remuñán-López, C., Coggiola, A., Lollo, G., Domard, A. & Alonso, M. J. (2007) Effect of molecular weight and degree of acetylation on the physicochemical characteristics of chitosan nanoparticles. En: fienel S., Vårum K.M. fiumnu M.M., H›ncal A.A. Advances in Chitin Science X, Alp Ofset, Ankara, 542-547.

(59) Kim, B.G. & Kang, I.J. (2006) Chitosan nanoparticles for the effective vaccine delivery system. NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech 2006. *Technical Proceedings*. 2: 388-391.

(60) Janes, K.A., Calvo, P. & Alonso, M.J. (2001) Polysaccharide colloidal particles as delivery system. NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show-NSTI Nanotech 2006 Technical Proceedings. 2: 388-391.

(61) Alonso, M.J. & Sanchez, A. (2003) The potential of chitosan in ocular drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol*. 55: 1451-1463.

(62) Prego, C., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) The potential of chitosan for the oral administration of peptides. *Expert Opin. Drug Del.* 2: 843-854.

(63) Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2006) Nanoparticular carriers for ocular drug delivery' in Torchilin V, Nanoparticles as Drug Carriers, London World Scientific-Imperial College Press, 649-674.

(64) Grenha, A., Seijo, B. & Remuñán-López C (2005) Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25(4/5): 427-434.

(65) De Campos, A.M., Diebold, Y., Carvahlo, E.S., Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2004) Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: in vitro stability, in vivo fate and cellular toxicity. *Pharm. Res.* 2: 803-810.

(66) Köping-Höggard, M., Sanchez, A. & Alonso M.J. (2005). Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert Rev. Vaccines.* 4: 185-196.

(67) Csaba, N., Garcia-Fuentes, M. & Alonso, M.J. (2006). The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 3: 463-478.

(68) Csaba, N., Sánchez, A., Fernández-Megía, E., Novoa-Carballal, R. & Alonso M.J. (2004) Chitosan nanoparticles for the delivery of plasmid DNA: preparation and characterization. *Eur. J. Pharm. Sci.* 23: 54.

(69) Bivas-Benita, M., Laloup, M., Versteyhe, S., Joelle, D., De Braekeleer, J., Jongert, E. & Borchard, G. (2003) Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan nanoparticles: preparation characterization, and preliminary in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 266: 17-27.

(70) Khatri, K., Goyal, A.K., Gupta, P.N., Mishra, N. & Vyas, S.P. (2006) Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B. *Int. J. Pharm.* 354: 235-241.

(71) Cui, F., Zhang, L., Zheng, J. & Kawashima, Y. (2004) A study of insulin-chitosan complex nanoparticles used for oral administration. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 14: 435-439.

(72) Behrens, I., Vila Pena, A.I., Alonso, M.J. & Kissel, T. (2002) Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport. *Pharm. Res.* 19: 1185.

(73) Loftsson, T. & Brewster, M.E. (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85: 1017-1025.

(74) Irie, T. & Uekama, K. (1999) Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36: 101-123.

(75) Dotsikas, Y. & Loukas, Y.L. (2002) Kinetic degradation study of insulin complexed with methyl-beta cyclodextrin. Conformation of complexation with electrospray mass spectroscopy and ^{1}H NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 487-494.

(76) Merkus, F.W., Verhoef, J.C., Marttin, E., Romeijn, S.G., van der Kuy, P.H.M., Hermens, W.A.J.J. & Schipper, N.G.M. (1999) Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 36: 41-57.

(77) Kobayashi, S., Kondo, S. & Juni, K. (1996) Pulmonary delivery of salmon calcitonin dry powders containing absoption enhancers in rats. *Pharm. Res*. 13: 80-83.

(78) Challa, R., Ahuja, A., Ali, J. & Khar, R.K. (2005) Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS Pharm. Sci. Tech*. 6: E329-E357.

(79) Da Silveira, A.M., Ponchel, G., Puisieux, F. & Duchene, D. (1998) Combined poly(isobutylcyanoacrylate) and cyclodextrins nanoparticles for enhancing the encapsulation of lipophilic drugs. Pharm. Res. 15: 1051-1055.

(80) Boudad, H., Legrand, P., Lebas, G., Cheron, M., Duchene, D. & Ponchel, G. (2001) Combined hydroxypropyl-β-cyclodextrin and poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles intended for oral administration of saquinavir. *Int. J. Pharm*. 218: 113-24.

(81) Maestrelli, F., Garcia-Fuentes, M., Mura, P. & Alonso, M.J. (2006) A new drug nanocarrier system consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 63: 79-86.

(82) Trapani, A., Garcia-Fuentes, M. & Alonso, M. J. (2008) Novel drug nanocarriers combining hydrophilic cyclodextrins and chitosan. *Nanotechnology*. 19: 185101.

(83) Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C. & Alonso, M.J. (2008) Chitosan/cyclodextrin nanoparticles can efficiently transfect the airway epithelium in vitro. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. En Prensa, Disponible en línea: DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.09.020.

(84) Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López. C. & Alonso. M.J. (2009) New Generation of Hybrid Poly/Oligosaccharide Nanoparticles as Carriers for the Nasal Delivery of Macromolecules. *Biomacromolecules*. DOI: 10.1021/bm800975j.

(85) Florea, B.I., Meaney, C., Junginger, H.E. & Borchard, G. (2002) Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSc*. 4: E12.

(86) Köping-Höggård, M., Vårum, K. M., Issa, M., Danielsen, S., Christensen, B. E., Stokke, B. T. & Artursson P. (2004) Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Therapy.* 11: 1441-1452.

(87) De la Fuente, M., Seijo, B. & Alonso, M. J. (2008) Bioadhesive hyaluronan/chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. *Gene Therapy*. 15: 668-676.

(88) Park, H. & Lee, K.-Y. (2008) Alginate hydrogels as matrices for tissue engineering. En: Natural-based polymers for biomedical applications. Eds. Reis R.L., Neves N.M., Mano J.F., Gomes M.E., Marques A.P. y Azevedo H.S. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, Inglaterra. Pp. 515-532.

(89) Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C. & Thom, D. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Lett.* 32: 195-198.

(90) Augst, A.D., Kong, H.J. & Mooney, D.J. (2006) Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol. Biosci.* 6: 623-633.

(91) Chen, J.L. & Cyr, G.N. (1970) Compositions producing adhesion through hydration. En: Manley R.S. Adhesion in Biological Systems. Academic Press, New York, 163-181.

(92) Smart, J.D., Kellaway, I.W. & Worthington, E.C. (1984) An in vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 36: 295-299.

(93) Batchelor, H.K., Banning, D., Dettmar, P.W., Hampson, F.C., Jolliffe, I.G. & Craig, D.Q.M. (2002) An in vitro mucosal model for prediction of the bioadhesion of alginate solutions to the oesophagus. *Int. J. Pharm.* 238: 123-132.

(94) Dettmar, P.W., Strugala, V., Tselepis, C. & Jankowski, J.A. (2007) The effect of alginates on deoxycholic-acid-induced changes in oesophageal mucosal biology at pH 4. *J. Biomat. Sci.-Polym. E.* 18: 317-333.

(95) Alonso, M.J., Goycoolea, F.M. & Higuera-Ciapara, I. (2008) Chitosan-polysaccharide blended nanoparticles for controlled drug delivery. En: Natural-based polymers for biomedical applications. Eds. Reis R.L., Neves N.M., Mano J.F., Gomes M.E., Marques A.P. y Azevedo H.S. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, Inglaterra. Pp. 644-679.

(96) De, S. & Robinson, D. (2003) Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate of poly-L-lysine-alginate nanospheres. *J. Control. Rel.* 89: 101-112.

(97) Douglas, K.L. & Tabrizian, M. (2005) Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. *J. Biomater Sci Polymer Edn.* 16: 43-56.

(98) Borges, O., Borchard, G., Coos Verhoef, J., de Sousa, A. & Junginger, H.E. (2005) Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int. J. Pharm.* 299: 155-166.

(99) Goycoolea, F.M., Lollo, G., Remuñán-López, C., Quaglia, F. & Alonso, M.J. (2009) Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for transmucosal delivery of macromolecules. *Biomacromolecules,* Submitted.

(100) Sarmento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Sampaio, P., Neufeld, R. & Ferreira, D. (2007) Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharm. Res*. 24: 2198-2206.

(101) Sarmento, B., Ferreira, D., Veiga, F. & Ribeiro, A. (2006) Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydr. Polym*. 66: 1-7.

(102) Kogan, G., Soltes, L., Stern, R. & Gemeiner, P. (2007) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett*. 29: 17-25.

(103) Alho, A.M. & Underhill, C.B. (1989) The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. *J. Cell. Biol*. 108: 1557-1565.

(104) Knudson, W., Chow, G. & Knudson, C.B. (2002) CD-44 mediated uptake and degradation of hyaluronan. Matrix Biol. 21: 15-23.

(105) De la Fuente, M., Seijo, B. & Alonso, M. J. (2008) Novel hyaluronan based nanocarriers for transmucosal delivery of macromolecules. *Macromol. Biosci*. 5: 441-450.

(106) Xu, S., Yamanaka, J., Sato, S., Miyama, I. & Yonese, M. (2000) Characteristics of complexes composed of sodium hyaluronate and bovine serum albumin. *Chem. Pharm. Bull*. 48 (6): 779-783.

(107) Gowland, G. (1998). Fourfold increase in efficiency of cyclosporin A when combined with hyaluronan: Evidence for mode of drug transport and targeting. *Int. J. Immunother*. 19 (1): 1-7.

(108) De la Fuente, M., Seijo, B. & Alonso, M. J. (2008) Design of novel polysaccharidic nanostructures for gene delivery. *Nanotechnology*. 19(7): art. no. 075105.

(109) Takada, M., Yuzuriha, T., Iwamoto, K. & Sunamoto, J. (1984). Increased lung uptake of liposomes coated with polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 80 :237-44.

(110) Tomizawa, H., Aramaki, Y., Fujii, Y., Hara, T., Suzuki, N., Yachi, K., Kikuchi, H. & Tsuchiya, S. (1993) Uptake of phosphatidylserine liposomes by rat Peyer's patches following intraluminal administration. *Pharm. Res*. 10: 549-552.

(111) Cui, Z., Hsu, C.H. & Mumper, R.J. (2003) Physical characterization and macrophage cell uptake of mannan-coated nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 29: 689-700.

(112) Alonso-Sande, M., Cuña, M., Reumñán-López, C., Teijeiro-Osorio, D., Alonso-Lebrero, J.L. & Alonso, M.J. (2006) Formation of new glucomannan-chitosan nanoparticles and study of their ability to associate and deliver proteins. *Macromolecules*. 39: 4152-4158.

(113) Cuña, M., Alonso-Sande, M., Remuñán-López, C., Pivel, J.P., Alonso-Lebrero, J.L. & Alonso, M.J. (2006) Development of Phosphorylated Glucomannan-coated chitosan nanoparticles as nanocarriers for protein delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 2887-2895.

(114) Alonso-Sande, M., Des Rieux, A., Schneider, Y.-C., Reumñán-López, C., Alonso, M.J. & Préat, V. (2006) Uptake studies of chitosan and chitosan- glucomannan nanoparticles in human intestinal FAE model. 33rd annual meet Controlled Release Society, Viena.

4. Nanosistemas lipídicos

DOLORES TORRES Y BEGOÑA SEIJO

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.

LIPOSOMAS
INTRODUCCIÓN: PERSPECTIVA GENERAL

Los liposomas fueron descubiertos en el año 1965 por Bangham y colaboradores (1), quienes constataron que ciertos lípidos pueden formar estructuras membranosas artificiales cuando están en presencia de un exceso de agua. Estas estructuras vesiculares, altamente organizadas, están constituidas por una pared formada por *lamelas* o bicapas lipídicas concéntricas que están separadas por un número igual de espacios de contenido acuoso (Figura 4.1). Para su elaboración,

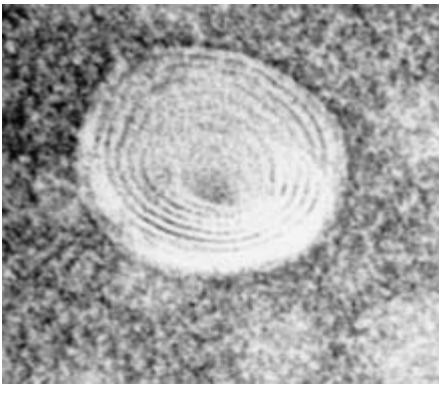


FIGURA 4.1. *Microfotografía de un liposoma obtenida por microscopía electrónica de transmisión, tras coloración negativa de las vesículas con ácido fosfotúngstico. Estructura vesicular constituida por la pared, formada por 6-7 lamelas, e igual número de compartimentos acuosos.*

habitualmente se utilizan fosfolípidos, con o sin la incorporación de colesterol o de otros materiales, introducidos en la pared de los liposomas con el fin de dotar a las vesículas de alguna propiedad particular (ej.: carga superficial).

Inicialmente estas vesículas se utilizaron como modelo de membranas biológicas, dada la similitud que presentan con ellas, pero muy pronto teniendo en cuenta su versatilidad estructural, así como su carácter biodegradable y biocompatible, se planteó su utilización en *Drug Delivery* siendo espectacular el número de trabajos publicados sobre la utilización de liposomas en este campo desde que, al principio de los años 70, Gregoriadis inició el estudio sobre el potencial que presentan como sistemas de liberación de fármacos y otras moléculas bioactivas (2).

La versatilidad de los liposomas (3) se refleja en primer lugar, en el hecho de que son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también de carácter anfifílico. Además, sus propiedades físicas como la carga superficial, el tamaño, la permeabilidad/rigidez de la pared o su capacidad de carga; pueden ser fácilmente modulables. Por último, utilizando lípidos funcionalizados, se pueden unir anticuerpos u otros ligandos a la superficie de estas vesículas, que se convierten en sistemas de transporte con capacidad para acceder por ejemplo, específicamente a un determinado tejido/célula tumoral (*site-specific targeting*), de una forma bastante parecida a la que es de suponer había previsto Paul Ehrilch cuando introdujo el concepto de *bala mágica* (4).

A pesar de todas estas ventajas, es indudable que también tienen limitaciones en cuanto a su utilización como sistemas de liberación, lo que sin duda explica que todavía no sea muy importante el número de formulaciones aprobadas y comercializadas para su uso en humanos. Entre estas limitaciones destaca su comportamiento desfavorable en el medio gastrointestinal, lo que limita las posibilidades que puedan ser administrados por vía oral, excepto que se introduzca alguna modificación sobre la estructura vesicular clásica (por ejemplo el recubrimiento de su superficie con un polímero adecuado), que permita superar este comportamiento inapropiado (5, 6). Como consecuencia, la mayor parte de los trabajos publicados se refieren a su utilización por vías de administración parenterales, como la intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal (7, 8), además de un grupo importante dedicado a explorar el interés que pueden tener como vehículos para la administración tópica cutánea y para la administración transdérmica (9, 10). Mas recientemente, la posibilidad de administrar liposomas en forma de aerosol por vía pulmonar ha sido objeto de estudio, no sólo para el tratamiento de enfermedades que cursan a nivel pulmonar (ej. asma, EPOC, fibrosis quística o tuberculosis), sino también para la administración de fármacos que actúen a nivel sistémico (11, 12).

NOMENCLATURA UTILIZADA EN *LIPOSOMOLOGÍA*

Para referirse a los distintos tipos de liposomas se puede recurrir al criterio que tiene en cuenta su tamaño y el número de bicapas o lamelas que conforman la pared de la estructura vesicular. Otra alternativa podría ser referirse a ello haciendo alusión al procedimiento por el que han sido obtenidos. Las dos posibles clasificaciones y la nomenclatura utilizada en cada caso se recogen en las Tablas 4.1 y 4.2.

TABLA 4.1. *Clasificación y nomenclatura de liposomas en función del tamaño y la lamelaridad.*

Abreviatura	Nombre completo/lamelaridad	Tamaño
MLV	Vesículas multilamelares	> 0.5 μm
OLV	Vesículas oligolamelares	0.1-1 μm
UV	Vesículas unilamelares	Todos los rangos de tamaños
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas	40-100 nm
LUV	Vesiculas unilamelares grandes	> 400 nm
GUV	Vesículas unilamelares gigantes	> 1 μm
MVV	Vesículas multivesiculares	> 1 μm

MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS

Los liposomas se pueden obtener aplicando distintas metodologías, que conducen a la formación de vesículas con características diferentes en función del procedimiento aplicado (tamaño y distribución de tamaños, lamelaridad, eficacia de asociación…), lo que sugiere que diversos mecanismos pueden estar implicados en este proceso de formación. El componente mayoritario de estas estructuras son lípidos (en particular fosfolípidos) que, cuando se encuentran en un medio acuoso a una temperatura próxima a su *temperatura de transición de fase*, tienen la capacidad de formar estas estructuras vesiculares cerradas, incluso de manera espontánea. Si la situación de partida es un *film lipídico que se hidrata* con una solución acuosa mediante agitación mecánica, entonces lo que se obtienen son vesículas multilaminares de tamaño relativamente grande y heterogéneo, siendo éste además de el primer procedimiento de fabricación propuesto, también el más sencillo y el más popular (1).

Tabla 4.2. *Clasificación y nomenclatura de liposomas en función del método de preparación*

Abreviatura	Nombre completo/método de preparación
REV	Vesículas uni u oligolamelares obtenidas por evaporación en fase reversa
MLV-REV	Vesículas multilamelares obtenidas por evaporación en fase reversa
SPLV	Vesículas estables plurilamelares
FATMLV	Vesículas multilamelares obtenidas por ciclos repetidos de congelación/descongelación
VET	Vesículas obtenidas por extrusión
LUVET	Vesículas unilamelares grandes obtenidas por extrusión
DRV	Vesículas obtenidas por deshidratación/rehidratación

Partiendo de estas vesículas multilaminares y aplicando *ultrasonidos*, se pueden obtener liposomas unilaminares de tamaño pequeño, tal y como propusieron por primera vez en 1962 Saunders y col. (13).

Para controlar el diámetro de vesícula, la lamelaridad y también la homogeneidad del tamaño de los MLV obtenidos por hidratación de una película de fosfolípidos, es posible aplicar un *procedimiento de extrusión* a la suspensión heterogénea de vesículas MLV, que consiste en hacerlas pasar a través de filtros de membrana de policarbonato con un tamaño de poro determinado. El número de veces que se repita esta operación, así como el diámetro de poro utilizado para llevarla a cabo, determina la lamelaridad y la dispersión de tamaños de la suspensión final de liposomas (8).

La formación de la película de lípidos que representa la primera etapa de la preparación liposomas MLV en todos los casos anteriormente citados, requiere el uso de importantes cantidades de disolventes orgánicos que plantean importantes problemas de toxicidad ya que pueden comprometer la seguridad del producto final obtenido, además de suponer un inconveniente serio para la obtención de liposomas a nivel industrial, dado el impacto medioambiental que supone el empleo de disolventes. Como consecuencia, se han propuesto procedimientos alternativos que requieren el uso de disolventes menos tóxicos, como el etanol, en los que la formación de los liposomas se produce por la *inyección de una solución etanólica de lípidos* en un medio acuoso de volumen considerablemente mayor. De esta manera los liposomas se forman espontáneamente, pudiendo controlarse mínimamente sus características (tamaño, lamelaridad,…) a

través de la relación de volúmenes de etanol/agua, la velocidad de inyección o la concentración inicial de lípidos utilizada (14). El etanol utilizado se puede eliminar fácilmente, por ejemplo por diálisis, si bien lo que limita en la práctica la utilización de este procedimiento es la posible inactivación de muchas biomoléculas en presencia del etanol.

Al final de la década de los 70, Szoka y Papahadjopoulos desarrollaron un procedimiento de preparación de liposomas al que denominaron *de evaporación en fase reversa*, mediante el cual se pueden obtener vesículas con un espacio central acuoso mucho más voluminoso (15). En este método se parte de una disolución de los fosfolípidos en éter etílico que se mezcla con una fase acuosa en una relación de volúmenes 1:3 (fase orgánica/fase acuosa). Esta mezcla se emulsifica por sonicación obteniéndose una suspensión de micelas invertidas. A continuación se elimina el éter a presión reducida (≈ 300 mm Hg), produciéndose al mismo tiempo una agregación de dichas micelas que conduce a la formación de una estructura tipo gel, la cual finalmente acaba por romper cuando se sigue incrementando el grado de vacio aplicado (≈ 700 mm Hg) para lograr la completa eliminación del disolvente orgánico. En todo este proceso las monocapas lipídicas que constituyen las micelas se sitúan lo suficientemente cerca unas de otras, como para dar lugar a las bicapas lipídicas que constituyen la pared de los liposomas. Las vesículas formadas de esta manera son de tipo uni u oligolaminar, con un tamaño medio entorno a 500 nm aunque bastante heterogéneo. La fuerza iónica de la solución acuosa determina la capacidad de encapsulación que van a tener las vesículas, la cual puede oscilar entre en 20 y el 65% (a menor fuerza iónica mayor eficacia de encapsulación). Posteriormente, el mismo Szoka (16), propuso la extrusión secuencial de los liposomas obtenidos en fase reversa, como alternativa para reducir tanto el tamaño como la polidispersión, si bien la eficacia de encapsulación disminuye en relación a las vesículas sin extruir.

Vesículas de tipo unilaminar pequeño se pueden obtener a partir de MLV por una técnica de *microfluidificación,* la cual consiste en producir colisiones entre los liposomas al hacerlos pasar rápidamente a presión, a través de filtros de membrana de 5 μm de diámetro. Este proceso se repite una serie de veces, de manera que se estima que después de 10 ciclos se pueden obtener SUV de tamaño inferior a 100 nm (17).

La *liofilización* de vesículas SUV seguida de una fase de *rehidratación* se ha propuesto como un procedimiento sencillo para obtener liposomas con elevada capacidad de encapsulación (18). Este método ha sido recientemente modificado de manera que es posible obtener liposomas de tamaño submicrométrico y con una dispersión muy estrecha, estériles y libres de pirógenos (19).

Finalmente, es posible obtener liposomas por un procedimiento denominado de *eliminación del detergente,* a partir de micelas mixtas formadas por una combinación de fosfolípidos y un detergente que preferiblemente debe presentar una concentración crítica micelar elevada y un bajo índice de agregación (p. ej. colato o desoxicolato sódico, octilglucósido o el Triton X-100). Para conseguir la eliminación del detergente que conduce a la formación de las vesículas, se puede acudir a una técnica de diálisis (8), aunque también es posible hacerlo mediante cromatografía de exclusión en gel o por un procedimiento de adsorción del detergente sobre partículas de resinas hidrofóbicas.

TIPOS DE LIPOSOMAS

Además de la clasificación habitual de los liposomas atendiendo a sus características fisicoquímicas o al proceso por el que han sido elaborados es posible realizar otra clasificación teniendo en cuenta más bien al comportamiento que previsiblemente tendrán los liposomas como consecuencia de las modificaciones que, con diferentes fines, se hayan podido introducir en su estructura. Desde este punto de vista, se podrían distinguir los siguientes tipos de liposomas:

- Liposomas convencionales.
- Liposomas de circulación prolongada o *stealth liposomas.*
- Liposomas catiónicos.
- Inmunoliposomas.

Liposomas convencionales

Son los liposomas clásicos de superficie hidrofóbica, constituidos por ejemplo por fosfatidilcolina y colesterol que, tras su administración i.v., son rápidamente recubiertos por las proteínas plasmáticas y a continuación eliminados de la circulación, tras ser fagocitados por células del RES (20).

Liposomas de circulación prolongada (Stealth liposomes)

La presencia de PEG en la superficie de los liposomas incrementa su hidrofilia, dando lugar a una reducción en la interacción con proteínas plasmáticas y lipoproteínas (21, 22).

Esta modificación de los liposomas a la cual, teniendo en cuenta el material utilizado se ha dado en llamar *pegilación*, sirve para conseguir dos funciones muy importantes: la primera, un incremento en la biodisponibilidad de los fármacos encapsulados, y la segunda, que el proceso de liberación sea más lento y que se minimice la toxicidad y los efectos secundarios (23). Además del PEG, otros poliméros como la poliacrilamida, el alcohol polivinílico o la polivinilpirrolidona, han sido utilizados para logar los mismos objetivos (24).

Especialmente destacable del comportamiento de estos liposomas pegilados es su capacidad para experimentar un proceso de extravasación en determinados lugares en los que se produce un incremento en la permeabilidad de la pared de los vasos sanguíneos, como puede ocurrir por ejemplo en zonas en las que hay un proceso infeccioso o una inflamación (20).

Liposomas catiónicos

Su principal aplicación es la vehiculización de material genético (25). Los lípidos catiónicos constitutivos de estos liposmas neutralizan la carga negativa del DNA, formando así una estructura compacta aunque diferente de la estructura vesicular típica de los liposmas. Estos complejos resultantes de la interacción entre en DNA y los lípidos catiónicos proporcionan una protección al material genético y promueven la internalización y la expresión del plásmido en el interior celular (20).

Inmunoliposomas

Estos liposomas tiene la capacidad de dirigirse específicamente y reconocer algunas células y órganos del cuerpo, gracias a la presencia de determinados elementos introducidos en el diseño de su estructura, como pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, unidos a la superficie de los liposomas (26). La elección del antígeno diana, la función del anticuerpo y el tipo del linker utilizado para lograr su unión a la la superficie (p. ej. PEG), son factores que requieren un análisis exhaustivo en el diseño de este tipo de liposomas (27).

APLICACIONES EN MEDICINA

Los liposomas han sido objeto de un considerable interés en el campo de la medicina, bien con fines terapéuticos o como herramientas de diagnóstico (3, 28,

29). Sus propiedades fisicoquímicas, como composición, tamaño y estabilidad del vehículo, pueden ser fácilmente modificados dependiendo de la aplicación concreta. Los liposomas han sido utilizados para proteger moléculas sensibles (p. ej. arabinósido de citosina, DNA, RNA, oligonucleótidos antisentido), para mejorar la captura intracelular y para cambiar el perfil farmacocinético y la biodistribución (tanto temporal como espacial) de la molécula encapsulada (30).

Desde el punto de vista de la administración, los liposomas pueden ser formulados como suspensiones líquidas inyectables, aerosoles, cremas o geles, que pueden ser administrados por diferentes vías, si bien lo más frecuente es que lo sean por inyección i.v. En la Tabla 4.3 se recogen las formulaciones de liposomas que están en el mercado y aquellas que se encuentran en una fase avanzada de investigación clínica, junto con la vía de administración y las patologías para la que se ha propuesto su uso.

TABLA 4.3. *Formulaciones que contienen liposomas, comercializadas o en fase de ensayo clínico para su utilización por diferentes vías y con distintos fines*

Vía administración/ Producto/Estatus	Molécula activa	Indicaciones
Administración i.v.		
Ambisome®	Anfotericina B	Infecciones fúngicas sistémicas
Daunosome®	Daunorubicina citrato	Sarcoma de Kaposi
Mikasome®	Amikacina	Infecciones bacterianas graves
Doxil/Caelix	Doxorubicina sulfato	Sarkoma de Kaposi y cáncer de ovario refractario
SPI 077 Fase II	Cisplatino	Carcinoma células escamosas de cabeza y cuello
Myocet®/Evacet	Doxorubicina citrato	Cáncer de mama metastásico en combinación con ciclofosfamida
Ventus® Fase III	Prostaglandina E1	Síndrome de distress respiratorio agudo
OSI 211 Fase II	Lurtotecan	Leucemia mieloide refractaria. Cáncer de ovario y pulmón de células pequeñas
Marqibo®	Vincristina	Linfoma no Hodgkin
Annamicina liposomal Fase II/III	Annamicina	Cáncer de mama
Aroplatin/Platar Fase I	Derivados de platino	Mesotelioma, cáncer colorrectal. Tumores sólidos
Atra i.v./Antragen®	Ácido all-trans retinoico	Leucemia promielocítica; Sarkoma de Kaposi
Visudyne®	Verteporfin	Degeneración macular húmeda en combinación con láser

Vía administración/ Producto/Estatus	Molécula activa	Indicaciones
Administración i.m.y otras		
Vacuna Novasome® Enfermedad de Newcastle	Virus muertos enfermedad de Newcastle	Enfermedad de Newcastle
Vacuna Novasome® Rheovirus Avian	Rheovirus Avian muertos	Enfermedades producidas por Rheovirus Avian
Hepaxal®	HAV	Hepatitis A
Inflexal®	Hemaglutinina y neuramidasa de H1N1H3N2 y B	Influenza
Pevi PRO y PEV3A Fase II	Epitopos sintéticos de *P. falciparum*	Malaria
DepoCyt (intratecal)	Citosina arabinosido	Meningitis linfomatosa y Neoplásica
Allovecvtin-7 (intralesional)		
Fase III	Plásmido HLA-B7	Terapia génica de cánceres metastásicos
Administración oral		
Vacuna Novasome *E. coli* 0157:H7	*E. coli* 0157 muertos	Infecciones por *E. coli*
Vacuna S. Flexneri 2A	S. Flexneri 2A muertos	Infecciones por S. flexneri
Administración tópica		
ELA- Max®	Lidocaina	Anestesia local, alivio temporal del dolor/ picor intenso
Dimericine®	Endonucleasa bacteriana T4N5	Trasplante renal Xeroderma pigmentosum
Administración tópica		
Pevary crema®	Econazol	Infecciones fúngicas tópicas
Dolant®	Diclofenaco	Antiinflamatorio tópico
Administración pulmonar		
Ambisome®	Anfotericina B	Infecciones fúngicas sistémicas; Trasplante pulmón; Aspergilosis: Leucemia mieloide aguda
Abelcet®	Anfotericina B	Infecciones fúngicas sistémicas; Trasplante de pulmón
9-N-Camptotecina	Camptotecina	Sarcoma de Erwing; Cáncer de Pulmón primario y metastásico; Cáncer de útero y endometrio
Cisplatino liposomado	Cisplatino	Cáncer de pulmón
Arikace	Amikacina	Fibrosis quística
Interleukina 2 liposomada	Interleukina 2	Metástasis pulmonares
Ciprofloxacino liposomado	Ciprofloxacino	Fibrosis quística
AeroLEF	Fentanilo	Dolores agudos cancerosos
Pentamidina liposomada	Pentamidina	Infecciones por VIH

Del análisis de los datos recogidos en esta tabla, la principal conclusión que se puede avanzar es que la mayor parte de las formulaciones que han alcanzado la fase de *ensayo clínico*, son formulaciones que han sido desarrolladas para el tratamiento de diferentes procesos cancerosos (29, 31). No obstante, dado que en esta misma monografía hay un apartado específico dedicado a la *Nanotecnología farmacéutica y cáncer*, en este capítulo no se hará una referencia explícita a esta aplicación concreta de los liposomas, ya que será tratada de manera conjunta con el resto de los *nanosistemas* en la citada sección.

Liposomas en infecciones

Puesto que los liposomas convencionales tras una administración i.v. sufren una captura importante por parte de las células fagocíticas, se pueden considerar vehículos ideales para dirigir medicamentos a los macrófagos, células que en muchos casos son hospedadoras de parásitos, hongos, virus y bacterias (18). Por otro lado, la encapsulación de agentes antiinfecciosos en liposomas de circulación prolongada puede modificar el perfil farmacocinético y de biodistribución del fármaco y, por lo tanto, lograr una mejora de su índice terapéutico.

Antifúngicos

Diversos antifúngicos han sido encapsulados en vesículas fosfolipídicas, entre los que se incluyen anfotericina B, nistatina, hamicina, ketoconazol, miconazol y econazol. Precisamente la formulación de anfotericina B liposomada, el *Ambisome*® (32), fue la primera que recibió la autorización para su comercialización y utilización en humanos. Diversos ensayos clínicos han demostrado la seguridad y la eficacia de esta formulación, que muestra un perfil de tolerabilidad mucho mejor en relación a la formulación comercial en la que el fármaco está en forma de micelas de desoxicolato (*Fungizone*). Su uso ha sido aprobado en USA y en Canada para el tratamiento de la leismaniasis visceral y también para el tratamiento de infecciones sistémicas o diseminadas producidas por *Candida, Aspergillus* o *Criptococcus,* en pacientes que son refractarios o intolerantes a una terapia convencional con anfotericina B. Su principal desventaja es su precio elevado si se compara con la formulación en la que el fármaco está bajo forma de micelas.

A esta primera formulación de este fármaco antifúngico han seguido otras dos, el *Abelcet*® y el *Amphotec*®, que son formulaciones ya comercializadas en

las que están presentes fosfolípidos aunque no bajo la forma concreta de liposomas. Esto justifica la disparidad de resultados obtenidos con ambas formulaciones en relación al *Ambisome*®, probablemente como consecuencia de la diferencia en los perfiles farmacocinéticos a que dan lugar: mientras que *Abelcet*® y el *Amphotec*® sufren un proceso de eliminación bastante rápidos, *Ambisome*® permanece en plasma durante un periodo de tiempo mucho mayor ($t^{1/2}$ = 6-10 horas en humanos y en animales).

Antibióticos y antivirales

Diversos antibióticos han sido incorporados en formulaciones de liposomas, con el fin de mejorar su perfil farmacocinético, para mejorar su interacción con algunos patógenos y/o para reducir su toxicidad. Además, y dado que tiene tendencia a acumularse en tejidos ricos en macrófagos, los liposomas pueden contribuir a mejorar la liberación de algunos fármacos de este tipo en el interior de la células que actúan como hospedadoras de ciertos patógenos como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*. Con esta idea, Gilead Sciences Inc. ha desarrollado *MiKasome*® que es una formulación de liposomas SUV que contiene el aminoglucósido *amikacina*. Tras su administración i.v. en ratas, ratones, monos y en humanos, se observa un aumento sustancial en el AUC y la vida media del antibiótico, en relación a los valores que se obtiene con el antibiótico libre. Se ha comprobado asimismo que *MiKasome*® exhibe una mayor actividad antibacteriana, en diferentes modelos tanto de infecciones intra como extracelulares. En este momento se lleva a cabo la Fase II del ensayo clínico diseñado para probar su utilidad para tratar infecciones bacterianas agudas en pacientes con fibrosis quística (8).

Además de antibióticos, los liposomas han sido estudiados como vehículos de una gran variedad de antivirales (p. ej.: *indinavir* o *ribavirina*) y de oligonucleótidos antisentido. Estas formulaciones pueden ser útiles para tratar infecciones virales y, en particular, para el tratamiento de la infección por HIV (34). En este caso, para que se pueda logar una disminución eficaz de la carga viral de HIV en reservorios presentes en células del tejido linfoide, resulta fundamental el empleo de vehículos liposomales altamente selectivos, como podrían ser inmunoliposomas, dirigidos específicamente a epitopos como el *determinante HLA-DR* del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II). Así, inmunoliposomas antiHLA-DR se han mostrado muy eficaces para liberar indinavir al tejido linfoide al menos hasta 15 días después de la inyección, aumentando hata 126 veces la acumulación del fárma-

co en nódulos linfáticos de ratones en relación al fármaco libre (35). Otros resultados obtenidos en estudios *in vitro* confirman el potencial de esta formulación, si bien hasta el momento no se han presentado resultados obtenidos tras su aplicación en modelos animales.

Liposomas en artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una de las enfermedades crónicas autoinmunes más comunes, junto con la esclerosis múltiple, la diabetes tipo I y la enfermedad de Crohn. Se caracteriza por una infiltración de las articulaciones afectadas por células derivadas de la sangre, principalmente neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Como repuesta a una activación, estas células producen citocinas y especies oxigenadas reactivas (ROS) que se liberan en importantes cantidades en el tejido circundante. El resultado es un estrés oxidativo que puede dar lugar a la destrucción de los constituyentes de la articulación afectada, como son el líquido sinovial, cartílago articular, lípidos y médula subcondral, si el sistema endógeno de defensa antioxidante no se pone en marcha (36, 37). Una de las características de la enfermedad artrítica es un aumento de la permeabilidad vascular a los coloides circulantes, lo que abre interesantes posibilidad al tratamiento con fármacos incorporados en formulaciones de liposomas. A ello hay que añadir el hecho de los fagocitos que están implicados en los procesos inflamatorios, son capaces de captar partículas coloidales para su eliminación y, en este sentido, también son una diana potencial muy fácil de alcanzar para un fármaco liposomado. Recientemente se ha analizado el potencial interés de diversas formulaciones de liposomas que incluyen fármacos para el tratamiento de procesos artríticos inflamatorios (38). Entre ellas se citan desde liposomas convencionales o liposomas de circulación prolongada a liposomas catiónicos, pH sensibles o inmunoliposomas, habiéndose explorado su utilidad con diversos fármacos como la prednisolona (ensayo clínico en Fase II de una formulación de liposomas pegilados), dexametasona, metotrexato, superoxidodismutasa, lactoferrina, clodronato o el celecoxib. Del análisis de los resultados se desprende que su aplicación en procesos artríticos es prometedora, sobre todo en lo que se refiere al diseño de formulaciones de liposomas funcionalmente modificados para conseguir un targeting activo en el propio entorno de la articulación enferma, bien sea incluyendo algún elemento de repuesta frente al pH, inductor de la adhesión/penetración o, incluso mejor, un elemento específico de dirección al tejido sinovial (39).

Liposomas en enfermedades respiratorias

La inhalación de aerosoles terapéuticos es, desde hace ya bastante tiempo, la mejor manera de administrar fármacos para que produzcan un efecto a nivel local en el pulmón si bien, en determinados casos, también es posible plantearse una administración de este tipo para lograr un efecto sistémico.

Además de las soluciones, suspensiones o partículas de polvo seco que tradicionalmente se han venido administrando en forma de aerosol, en los últimos años ha ido creciendo el interés por los liposomas como sistema adecuado para administrar fármacos en forma de aerosol por inhalación (40), no sólo para el tratamiento de patologías que afectan e este órgano, como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la fibrosis quística o la tubercolosis; si no también para tratar de aprovechar las ventajas de la vía pulmonar para lograr un efecto a nivel sistémico.

Los liposomas como vehículos para la administración pulmonar presentan indudables ventajas y han sido investigados para fármacos de diferentes grupos terapéuticos, como antibióticos, agentes citotóxicos, antioxidantes, compuestos antiasmáticos, así como también material genético recombinante para el tratamiento de la fibrosis quística. En el diseño de liposomas con características adecuadas para la vía pulmonar, se debe prestar especial atención a la estabilidad de la estructura vesicular para evitar la liberación prematura del material encapsulado. En este sentido, la composición lipídica y el tamaño medio de vesícula son dos propiedades de especial importancia. La composición lipídica condiciona la rigidez de la membrana liposomal y, por tanto, también tiene influencia sobre la fuga prematura del material encapsulado, particularmente cuando la temperatura durante la nebulización es mayor que la temperatura de transición de fase (Tc) de la mezcla lipídica (41). La nebulización es el procedimiento habitual para generar una *niebla* aerosol inhalable a partir de suspensiones de liposomas, por ejemplo a través de dispositivos que funcionan por ultrasonidos o vibración o por aire comprimido (42).

El empleo de formulaciones de liposomas por vía pulmonar resulta particularmente atractivo para el tratamiento de patologías localizadas en el pulmón y, en particular, de diversos procesos infecciosos. Así por ejemplo, el ciprofloxacino que es un antibiótico de amplio espectro muy potente, con una muy buena actividad frente a bacterias Gram-negativas y cocos Gram+, en ocasiones falla a la hora de lograr niveles adecuados en el lugar de infección tras una administración por vía oral o i.v. Su incorporación a vesículas elaboradas con una mezcla de fosfatidilcolina y colesterol, y la posterior administración por vía

pulmonar de la suspensión de liposomas nebulizada, da lugar a niveles mucho más elevados del fármaco así como a una retención más prolongada en el tracto respiratorio inferior, en comparación con el fármaco sin encapsular. Los estudios se llevaron a cabo en ratones, comprobándose que la formulación de liposomas de ciprofloxacino es capaz de erradicar la infección por *Francisella tularensis* mientras que el fármaco no encpasulado se mostró totalmente ineficaz (43).

Anfotericina B es un antifungico que también ha sido estudiado bajo la forma de liposomas por vía pulmonar, en este caso para el tratamiento de infecciones por candida a nivel sistémico. Se trata de un potente agente antifúngico que presenta una elevada toxicidad a nivel renal, la cual es el principal factor limitante para su utilización en clínica y que se ve drásticamente reducida tras su incorporación en liposomas (32). Tras la administración en forma de aerosol de la anfotericina liposomada ha sido posible alcanzar la concentración mínima inhibitoria en el pulmón, mientras que tras su administración por vía i.v., no se ha conseguido (44).

Algunos microorganismos patógenos intracelulares, como *M. tuberculosis, F tularensis* o *C. pneumoniae* son capces de sobrevivir y proliferar después de ser fagocitados por los macrófagos alveolares. Estudios realizados por Leemans y col. demuestran que la depleción de macrófagos alveolares en ratones infectados por *M. tuberculosis* tras la administración intranasal de liposomas en los que se encapsula diclorometileno difosfonato, produce una mejora importante en la infección micobacterial (45). Igualmente se evaluó la eficacia de la administración pulmonar de ciprofloxacino incorporado en liposomas modificados con manosa para el tratamiento de infecciones parasítarias intracelulares, demostrándose que los liposomas manosilados resultan claramente mucho más eficaces que los no modificados (46).

El pulmón es un órgano en el que de forma habitual se presentan tumores malignos primarios, pero todavía con más frecuencia procesos metastásicos. Con mucha frecuencia el diagnóstico se produce demasiado tarde y, por ese motivo, la supervivencia es siempre muy baja y se reducen mucho las posibilidades de aplicar un tratamiento quirúrgico. La alternativa a la que únicamente es posible acudir es un tratamiento quimioterápico que, si es sistémico, tiene unas posibilidades de éxito muy reducidas a nivel pulmonar. Se ha sugerido entones la administración de citocinas inmunoestimulantes en forma de aerosol, si bien su corta vida media y sus problemas de solubilidad limitan mucho la efectividad del tratamiento (47). Ante esta situación, se han desarrollado formulaciones de liposomas conteniendo estas citocina (IL-1, IL-2, IL-6, GM-CSF y IFN-γ) que

han sido investigados con éxito en diferentes modelos animales de cáncer de pulmón (48).

Otros fármacos anticancerosos, como el cisplatino, paclitaxel o la 9-nitrocamptotecina también han sido incorporados en formulaciones de liposomas que han sido administrados por vía pulmonar después de ser nebulizados, habiéndose evaluado el efecto en varios modelos animales y en las primeras fases de los ensayos clínicos, en los que se han incluido pacientes con tumores primarios o metástasis que no responden a los tratamientos convencionales (40). En algunos de ellos se han observado remisiones parciales que confirman el potencial que presentan los liposomas de 9-nitrocamptotecina administrados en forma de aerosol. En el caso de los liposomas de cisplatino, se ha observado una reducción drástica de la toxicidad del fármaco a nivel sistémico en aerosol (49), apreciándose una buena respuesta en conjunto en prácticamente todos los pacientes que participaron en la Fase I del ensayo clínico.

Otra interesante estrategia en la que en estos momentos se trabaja intensamente en administración pulmonar, es la liberación de material genético por inhalación, ya que abre nuevas perspectivas de tratamiento para un amplio abanico de enfermedades entre las que se incluyen el cáncer de pulmón, la fibrosis quística o el asma. La terapia génica mediante aerosolización permite alcanzar el pulmón por un método no invasivo, con la ventaja adicional de lograr una alta concentración del material directamente en la diana (40). No obstante, la nebulización de material genético desnudo tiene como resultado la rápida destrucción de estas macromoléculas que son tan frágiles como complejas. De ello se deduce que sólo a través de su complejación o, mejor aún, de su encapsulación en un vehículo adecuado, podrá ser utilizado con éxito (50).

Por último, en lo que se refiere a la administración de liposomas por vía pulmonar, se debe citar la posibilidad de utilizar este tipo de administración, en el caso de péptidos y proteínas que sufren un proceso de degradación intenso tras su administración por vía oral. Para estas moléculas, durante mucho tiempo, la vía parenteral ha sido la única alternativa, si bien en este momento la vía pulmonar representa una posibilidad real de administración, simpre que sea posible evitar la degradación que puedan sufrir por acción de las proteasas y/o la eliminación prematura por acción de los macrófagos alveolares (40). Precisamente en este sentido, la incorporación de un péptido o proteína a la estructura de un liposoma puede ser una alternativa muy interesante para evitar estos inconvenientes y lograr de este modo una mejora en su biodisponibilidad (51).

Liposomas en enfermedades oculares

La deficiente biodisponibilidad de los fármacos que se obtiene con las formas farmacéuticas de administración ocular, en particular si son de administración tópica, es consecuencia de todas las vías de pérdida características de este lugar anatómico, así como también de impermeabilidad del epitelio corneal y de la absorción no productiva a través de la conjuntiva y la esclera. Como consecuencia, utilizando las formas de dosificación convencionales (soluciones, suspensiones o pomadas oftálmicas), no se consiguen niveles terapéuticos suficientemente altos como para poder tratar determinadas enfermedades oculares (52). Las inyecciones intravítreas son la alternativa habitual para tratar las patologías que afectan al segmento posterior del ojo, si bien conllevan un considerable riesgo de que se produzcan complicaciones, particularmente en aquellos casos en los que se requieran inyecciones repetidas.

Como consecuencia de todo lo anteriormente comentado, una de las tendencias actuales en terapéutica ocular sugiere la conveniencia de reemplazar las formas de administración ocular convencionales, por nuevos sistemas de administración de fármacos con propiedades biofarmacéuticas mucho mejores y con capacidad para liberar el agente terapéutico de una forma mucho más precisa en el lugar diana en el ojo y, si es posible, de una manera predecible (53). Entre estos nuevos sistemas, sin duda los sistemas coloidales como liposomas, niosomas, nanoemulsiones o nanopartículas, ofrecen expectativas muy prometedoras (54). Los liposomas en administración ocular ofrecen numerosas ventajas ya que además de biodegradables y relativamente no tóxicos, facilitan un contacto íntimo con las superficies de la córnea y conjuntiva, incrementa la posibilidad de absorción ocular del fármaco encapsulado, lo que tiene especial importancia, en el caso de fármacos que presenten un reducido coeficiente de reparto y solubilidad deficiente, además de aquellos de peso molecular medio o elevado (55, 56). En muchos casos se comprobó que su comportamiento favorable estaba ligado a la presencia de carga positiva en su superficie (52), que favorece su interacción con el epitelio corneal, a su vez cargado negativamente.

Más recientemente, los liposomas han sido estudiados como vehículos capaces de incorporar anticuerpos de reconocimiento celular específico y también de material genético (56), en este caso por su previsible capacidad para dirigirlo al núcleo de las células corneales después de su administración tópica (57) e intravítrea (58). En estos estudios se demuestra la capacidad de transfección de los liposomas y se comprueba que, tras inyección intravítrea, son capaces de proteger eficazmente a los oligonucleótidos de la degradación por acción de las nucleasas.

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

Las nanopartículas lipídicas se prepararon por primera vez a comienzos de los años 90, mediante dos técnicas diferentes: homogeneización a alta presión y mediante la formación de una microemulsión, ambas a alta temperatura (59, 60). Desde ese momento, el número de grupos que han centrado su investigación en este área ha ido creciendo considerablemente y, hoy en día, son más de 40 los grupos implicados (61). Durante este período, el número de patentes relacionadas ha ido creciendo también significativamente, incorporándose dos nuevos métodos para la producción de nanosistemas lipídicos, como son los de emulsión-evaporación del disolvente y emulsión-difusión del disolvente (62).

El interés creciente que suscita este tipo de sistemas radica especialmente en algunas propiedades que los caracteriza, como son la inocuidad de sus componentes y métodos, especialmente los que evitan disolventes, y en su biocompatibilidad y facilidad de escalado industrial. Son partículas que comparten similitudes con otros nanosistemas como los liposomas, en cuanto a su naturaleza lipídica, y las nanopartículas poliméricas, en este caso, en cuanto a su estructura matricial sólida. Sin embargo, nacen con la finalidad de superar algunos de los inconvenientes asociados a ambos sistemas, como son los problemas de estabilidad de los liposomas, o bien la potencial toxicicidad asociada a algunos polímeros y disolventes utilizados en la preparación de las nanopartículas poliméricas.

Las nanopartículas lipídicas están constituídas por lípidos biodegradables y bien tolerados, y por agentes emulsificantes tanto lipofílicos, como hidrofílicos. Podemos citar entre los lípidos más utilizados triglicéridos como la triestearina, la tripalmitina, la trilaurina; grasas como las series Witepsol®, el behenato de glicerilo, el palmitato de cetilo; ácidos grasos como el ácido esteárico o el palmítico. Entre los agentes tensoactivos lipofílicos, destacan la lecitina de soja, el polisorbato 80, mientras que entre los hidrofílicos, destaca como más utilizado el poloxámero 188.

Los excipientes usados en la preparación de nanopartículas lipídicas para administración oral y cutánea, son materiales ya aceptados por las autoridades regulatorias para otras formas tradicionales, como comprimidos, pelets, cápsulas y cremas. En el caso de la administración parenteral, los lípidos propuestos son glicéridos, que están constituídos por ácidos grasos, habitualmente utilizados en la nutrición parenteral.

Otras características que indican la versatilidad de estos nanosistemas se podrían concretar en los siguientes puntos (61, 62).

— Capacidad de encapsulación tanto de moléculas lipofílicas como hidrofílicas.
— Posibilidad de lograr perfiles de liberación sostenida del fármaco.
— Rápida internalización por parte de líneas celulares (5-10 min).
— Posibilidad de recubrimiento con polímeros que modifican sus características como:
  - El polietilenglicol (PEG), o poloxámeros que las convierten en sistemas de permanencia prolongada en el organismo.
  - El quitosano u otros polímeros mucoadhesivos, que potencian su interacción con mucosas (63).

Su versatilidad se refiere también a la posibilidad de ser administradas por diferentes vías de administración como la endovenosa (64-66), oral (67, 68), cutánea (69, 70), transdérmica (71), pulmonar (72) y ocular (73).

Junto con estas ventajosas características, las nanopartículas lipídicas poseen también ciertas limitaciones, como por ejemplo, la baja capacidad de encapsulación de un determinado número de moléculas y la posible expulsión de las mismas durante el almacenamiento. El hecho de que los lípidos, especialmente los más purificados, cristalicen en una perfecta estructura cristalina, es lo que hace que quede poco espacio para alojar a las moléculas de fármaco. Además, tras su producción, las nanopartículas lipídicas cristalizan en estados altamente energéticos, como α y β. Durante el almacenamiento, las moléculas lipídicas experimentan un proceso de reestructuración, dando lugar a estados de baja energia βi y β. Por lo tanto, cuanto más perfecta es la estructura cristalina, mayor tendencia habrá a la expulsión del fármaco (74).

Para superar estas limitaciones, se han desarrollado un nuevo tipo de nanosistemas: los portadores lipídicos nanoestructurados (75). El fundamento de estos nuevos sistemas es la creación de una matriz lipídica lo más imperfecta posible. Ello se consigue mezclando lípidos sólidos y líquidos que forman partículas que poseen una mayor capacidad de carga y minimizan la expulsión del fármaco durante el almacenamiento Frecuentemente, son mezclas de los lípidos sólidos citados anteriormente con el aceite Migliol 812®, constituído por triglicéridos de cadena media derivados del ác. cáprico y caprílico.

Metodología de producción de nanopartículas lipídicas

Las técnicas principales de preparación son la homogeneización a alta presión, la preparación vía microemulsión y la técnica de emulsión-evaporación del disolvente.

Técnica de Homogeneización a alta presión

Esta técnica de preparación ha sido desarrollada por Müller y Luks (60). En el procedimiento clásico, *homogeneización en caliente*, el lípido fundido conteniendo el principio activo, se emulsifica en una solución acuosa que incluye el agente tensoactivo, y se encuentra a la misma temperatura que el lípido, mediante agitación a elevada velocidad o ultrasonidos. A continuación, la preemulsión se somete a homogeneización a alta presión. Como condiciones típicas de producción, se repiten 500 bares de presión, y entre 3-5 ciclos de homogeneización. Finalmente, la nanoemulsión se enfría, la fase lipídica se solidifica, y se forma la suspensión de nanopartículas lipídicas.

Esta técnica está especialmente dirigida a la encapsulación de moléculas lipofílicas, ya que las hidrofílicas difunden en gran proporción a la fase acuosa durante la fase de homogeneización, dando lugar a un baja eficacia de encapsulación. Uno de los inconvenientes que presenta esta tecnología es la exposición de los principios activos a altas temperaturas, aunque durante un tiempo muy corto, lo que permite que compuestos sensibles a la temperatura puedan resistir el proceso.

Para la encapsulación de fármacos hidrofílicos, se diseñó un procedimiento denominado de *homogeneización en frio*, en el que el lípido fundido se enfria de manera rápida en hielo seco o nitrógeno líquido. De esta manera se incrementa la fragilidad del lípido, para facilitar el proceso posterior de molienda en mortero o mortero de bolas, destinado a obtener micropartículas de 50-100 m. Estas micropartículas se dispersan en una solución fría del tensoactivo y, finalmente, la suspensión se somete a homogeneización a alta presión a temperatura ambiente, o por debajo de ésta (76).

Técnica de Preparación vía microemulsión

Este método (59) se fundamenta en el mecanismo básico de las microemulsiones, a las que se transforma en una nanoemulsión ultrafina tras la ruptura de las mismas por adición, por ejemplo, de un determinado volumen de agua.

En la formación de la microemulsión, el lípido se funde, y en él se disuelve el fármaco. A continuación se añaden a alta temperatura, el tensoactivo, cotensoactivo y agua para formar la microemulsión, que se vierte sobre agua fría, rompiéndose en nanogotículas de emulsión, que cristalizan para formar las nanopartículas lipídicas.

Como inconvenientes de este procedimiento, podemos señalar la alta concentración de tensoactivos y cotensoactivos que se requiere, como por ejemplo el butanol, muy poco deseable desde el punto de vista regulatorio; la utilización de disolventes para formar la microemulsión y la elevada dilución a la que se someten finalmente las partículas, que da lugar a que el contenido final en partículas se sitúe habitualmente por debajo del 1%.

Técnica de Emulsificación-evaporación del disolvente

Este método, ampliamente utilizado en la preparación de micro y nanopartículas poliméricas, fue aplicado por primera vez en la preparación de nanopartículas lipídicas por Sjöström y Bergensähl (77). El material lipídico, en este caso, se disuelve en un disolvente orgánico inmiscible en agua, como el diclorometano, en el que se solubiliza también el principio activo. Esta fase orgánica se emulsifica en una fase acuosa que contiene el agente tensoactivo, mediante agitación mecánica o sonda de ultrasonidos. Tras la evaporación del disolvente bajo agitación, o presión reducida, se forma la dispersión de nanopartículas tras la precipitación del lípido.

La utilización de una doble emulsión w/o/w en esta técnica, ha permitido la encapsulación de antígenos (78) o péptidos como la calcitonina y la insulina (63, 79).

Técnica de Emulsificación-difusión del disolvente

Esta técnica comparte similitudes con la anterior, diferenciándose únicamente en el método de precipitación del lípido a partir de la emulsión. En este caso se consigue añadiendo un volumen extra de agua a la fase acuosa, lo que provoca la difusión inmediata del disolvente orgánico, con la consecuente precipitación del lípido. Trotta y col. (80), utilizaron esta técnica para encapsular el péptido insulina, consiguiendo eficacias de encapsulación del 80%.

Una técnica muy similar, la de desplazamiento del disolvente, en la que simplemente no se parte de una emulsión, sino que el disolvente miscible con agua difunde rápidamente a la fase acuosa, fue utilizada con éxito para preparar nanopartículas lipídicas conteniendo gonadorelina (81).

Aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas lipídicas

Administración endovenosa

La administración endovenosa de nanopartículas lipídicas ha sido estudiada con distintas finalidades: las más importantes, la vehiculización de antitumorales a la diana tumoral (65, 66) y la vehiculización de fármacos a cerebro (82), como trataremos más adelante (apartados a y b). De un modo general, distintos estudios han evaluado la alteración del comportamiento farmacocinético de determinadas moléculas tras ser administradas por vía endovenosa incluídas en nanopartículas lipídicas. Así se ha podido comprobar que simplemente tras la inclusión en nanopartículas lipídicas de antitumorales como la camptotecina (83) o la doxorubicina (84, 86), su área bajo la curva (AUC) se veía incrementada entre 3 y 20 veces, en comparación a la solución del fármaco. Las semividas de eliminación también experimentaron un aumento considerable, aun sin tratarse de sistemas de permanencia prolongada, ya que en la mayor parte de los nanosistemas era la lecitina el único estabilizante empleado.

En estos estudios llevados a cabo con la doxorubicina (85, 86), se demostró igualmente que la distribución del fármacos a corazón disminuía, cuando se encontraba incluído en nanopartículas, hecho de particular importancia al tratarse de un fármaco cuya cardiotoxicidad es una de sus principales limitaciones.

El recubrimiento con PEG-2000 mejoró la capacidad de las nanopartículas de evitar el aclaramiento por parte del sistema retículo endotelial (83, 85), dando lugar a mayores incrementos en el AUC y en la semivida de eliminación. Es de destacar la clara relación existente entre el porcentaje de PEG incorporado en las nanopartículas y el incremento en el AUC, o en la semivida de eliminación logrados (83). Así, la incorporación de un 0.15, 0.30 y 0.45% de estearato de PEG 2000, con respecto a la microemulsión lipídica, dio lugar a valores crecientes de AUC de doxorubicina (260, 318 y 433 μg ml^{-1} min).

Las nanopartículas lipídicas en la terapia antitumoral

Targeting tumoral

Los estudios de biodistribución de antitumorales en nanopartículas lipídicas llevados a cabo hasta el momento hacen que éstas puedan considerarse ventajosas desde un punto de vista terapéutico (83, 86). Sin embargo, la mayoría de ellos se realizaron en animales sanos, y no en animales con tumores. Por lo tan-

to, el hecho de que las nanopartículas puedan incrementar la concentración de fármaco en el tumor, debido a una mayor permeabilidad y retención por parte del tumor (efecto EPR), no está todavía muy demostrado. A este respecto, son muy prometedores los resultados obtenidos por Reddy y col. (87) en un reciente estudio llevado a cabo en ratones a los que se había implantado un linfoma tipo Dalton. En él, se comparó la biodistribución de etopósido marcado con tecnecio^{99} libre o incluído en nanopartículas lipídicas, comprobándose que, tras su administración i.v., la concentración del radiofármaco se incrementaba un 67% al cabo de 1 hora, y un 30% tras 24 horas postinyección. Curiosamente, las concentraciones fueron aun mayores, cuando las nanopartículas se inyectaron subcutánea o intraperitonealmente, probablemente debido a la lenta y progresiva difusión desde el lugar de inyección.

Eficacia antitumoral

Con respecto a la eficacia antitumoral, la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo *in vitro* en cultivos celulares, llegando en algún caso a la administración *in vivo* en ratones desnudos a los que se había implantado un determinado tumor. Destaca un estudio llevado a cabo por Serpe y col. (88) en el que se evaluó la citotoxicidad de formulaciones de nanopartículas lipídicas conteniendo butirato de colesterilo, doxorubicina o paclitaxel, sobre la línea de cáncer colorectal HT-29. Frente a estos dos últimos fármacos, considerados citostáticos ya clásicos en la terapia antitumoral, el butirato de colesterilo es un nuevo agente identificado para el tratamiento del cáncer. Tanto el butirato de colesterilo como la doxorubicina, incluidos en nanopartículas, mostraron valores de IC_{50} (concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular) considerablemente inferiores a los correspondientes de las soluciones convencionales del fármaco libre. En el caso del paclitaxel, no se observaron diferencias entre los valores de IC_{50}, correspondientes a la formulación de nanopartículas y a la solución del fármaco, sin embargo, cabe destacar el hecho de que en el caso de las nanopartículas lipídicas, la citotoxicidad se debe únicamente al fármaco formulado en dichos vehículos, mientras que en la formulación clásica de paclitaxel, es el diluyente (Cremophor EL) en parte el responsable del efecto citotóxico.

Se ha evaluado igualmente el efecto de nanopartículas lipídicas conteniendo doxorubicina sobre líneas tumorales resistentes a fármacos, como es el caso de las líneas de cáncer de mama murino EMT6/AR1 y humano MDA435/LCC6/MDR1, que sobreexpresan glicoproteína-P (89, 90). En este caso, las nanopartículas, de-

nominadas *híbridas* por estar constituídas por un lípido (ac. esteárico) y un polímero (derivado del aceite de soja), demostraron una mayor captura y retención de doxorubicina por parte de las células resistentes, llegando a ser 8 veces más eficaces que la doxorubicina en solución al inhibir el crecimiento de las células tumorales. Estos resultados confirmaron la capacidad de penetración de las nanopartículas lipídicas en las células tumorales, salvando los mecanismos de multiresistencia celulares. Finalmente, estos sistemas híbridos se evaluaron *in vivo*, tras inyección tumoral en ratones a los que se había implantado el tumor sólido EMT6, procedente de carcinoma de mama (91). Se pudo apreciar un retraso significativo en el crecimiento del tumor, así como la aparición de necrosis tumorales con mínima toxicidad sistémica.

Llama la atención en este estudio, sin embargo, la ausencia de un control tan imprescindible para valorar la trascendencia de los resultados, como es la administración del fármaco en solución.

Las nanopartículas lipídicas y su acceso al Sistema Nervioso Central

En los años 90, las nanopartículas lipídicas se propusieron como vehículos para la liberación de fármacos a cerebro, de manera independiente por dos grupos de investigación diferentes (83, 84), aunque realmente la primera prueba del transporte de partículas lipídicas a través de la barrera sangre-cerebro, había aparecido con anterioridad (92). Concretamente, fue al estudiar la farmacocinética de dos antitumorales, la camptotecina y la doxorubicina, cuando se observó acumulación de los fármacos en cerebro, tanto tras administración oral como i.v. cuando se incluyeron en nanopartículas.

Como ya se demostró para otro tipo de partículas como las de policianoacrilato de alquilo, cuando la superficie de las partículas se modificó con derivados del PEG, o tensoactivos que contenían PEG, el acceso a cerebro mejoró notablemente (83, 86, 93). Igualmente, la modificación de la carga superficial produjo cambios en la distribución a cerebro (94). Así, se comprobó que nanopartículas de tripalmitina conteniendo etopósido y cargadas positivamente (+5 mV; 391 nm), mostraban una mayor acumulación en cerebro que las de carga negativa (-47 mV; 362 nm). También, cuando se compararon nanopartículas de tripalmitina conteniendo clozapina se observó un AUC superior, y una mayor distribución a cerebro cuando estaban recubiertas de estearilamina (+23.2 mV), en comparación a las no recubiertas (+ 0.2 mV) (95). Sin embargo, la mayor penetración cerebral de las nanopartículas cargadas positivamente, podría estar relacionada con una mayor toxicidad, como así se puede desprender de un es-

tudio de perfusión in situ en cerebro de ratas en el que la alteración de la integridad de la barrera hematoencefálica es comparativamente más acusada para las partículas positivas (96).

Administración oral

Las nanopartículas lipídicas son especialmente interesantes para su utilización por vía oral, por diferentes motivos. En primer lugar, por las propiedades mucoadhesivas que presentan debido a su naturaleza coloidal, y a las que se atribuye el hecho de facilitar la liberación del fármaco en la zona del intestino a la que se adhieren. Por otra parte, existe la posibilidad de que sean internalizadas por las células intestinales, y además, hay que tener en cuenta que los lípidos constituyentes de las mismas tengan un efecto promotor de la absorción.

La capacidad promotora de la absorción de los lípidos, ha sido explicada de manera específica en los estudios de W. Charman y col. (97, 98). Así, los lípidos serían degradados por enzimas digestivos, convirtiéndose en mono y diglicéridos, que se soltarían formando micelas. En estas micelas se incorporaría el fármaco, y tras interaccionar con las sales biliares, se formarían las denominadas *micelas mixtas*, a través de las cuales se facilitaría la absorción del fármaco.

Se ha demostrado, además, la influencia de la estructura sobre la potencia promotora de los lípidos. Así, los triglicéridos de cadena larga son más efectivos que los de cadena media al promover la absorción de fármacos como la halofantrina (99). También la longitud de la cadena del ácido graso afecta al tipo de absorción que pueda tener lugar. Es interesante también el hecho de que se haya demostrado la captura linfática de nanopartículas lipídicas, tras su administración intraduodenal (100).

Se han llevado a cabo estudios *in vivo* con nanopartículas lipídicas administradas por vía oral conteniendo tobramicina (101, 102), clozapina (95), rifampicina, isoniazida y pirazinamida (103), camptotecina (104), en los que se ha demostrado que los vehículos lipídicos son capaces de mejorar tanto la biodisponibilidad como las propiedades farmacocinéticas de éstas moléculas.

También en el caso de la administración oral de moléculas peptídicas se han obtenido interesantes resultados. Así, nuestro grupo ha diseñado para tal fin nanopartículas lipídicas recubiertas con polímeros hidrofílicos como el PEG o el quitosano (63, 105, 106) (Figura 4.2), demostrando que ambas eran captadas de un modo similar por parte de células Caco-2. Cuando estas nanopartículas conteniendo calcitonina, se administraron por vía oral a ratas, las nanopartículas re-

cubiertas de quitosano lograron un marcado y prolongado efecto hipocalcémico, que no apareció sin embargo tras la administración de las recubiertas de PEG (105, 106) (Figura 4.3). La probable explicación de este efecto ha de relacionarse tanto con la mucoadhesión del quitosano como con la apertura de las uniones intercelulares que el quitosano promueve.

Administración pulmonar

Una de las vías exploradas para las nanopartículas lipídicas ha sido la pulmonar. Concretamente, se ha estudiado su distribución tras ser aerosolizadas a

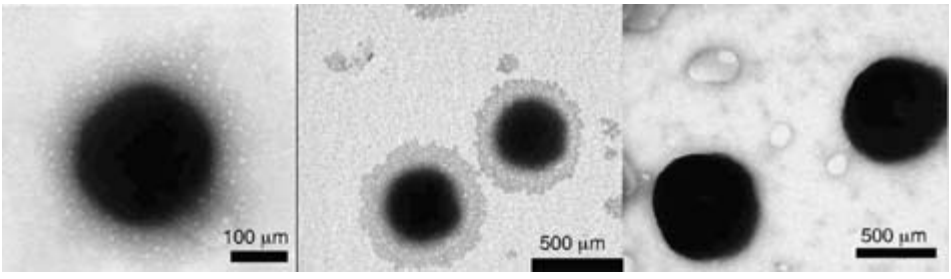


FIGURA 4.2. *Fotografías obtenidas por microscopía electronica de transmision de nanopartículas de tripalmitina recubiertas de PEG (izquierda), nanopartículas de tripalmitina/Miglyol® 812 recubiertas de PEG (medio) y nanopartículas de tripalmitina recubiertas de quitosano (derecha) (Tomado de ref. 105).*

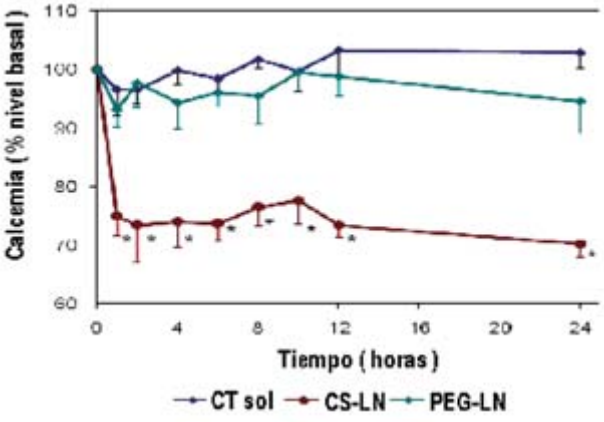


FIGURA 4.3. *Niveles de calcemia en suero obtenidos tras la administración intragástrica de una solución de calcitonina (CT Sol), de nanopartículas de tripalmitina conteniendo calcitonina recubiertas de de quitosano (CS-LN) o de PEG (PEG-LN) (media ± e.e., n = 6); *diferencias significativas al comparar CS-LN con CT Sol o con PEG-LN, ·α< 0.05 (Tomado de ref. 105).*

ratas mediante un nebulizador ultrasónico, o bien administradas por vía intratraqueal (72, 107). Las nanopartículas, marcadas con ^{99m}Tc fueron seguidas mediante gammagrafía, comprobándose su rápido acceso a nódulos linfáticos regionales, y sugiriéndose la fagocitosis por macrófagos alveolares como el mecanismo más probable de captura. La acumulación observada en nódulos linfáticos también ha hecho que las nanopartículas lipídicas sean propuestas como vehículos terapéuticos tras su liberación pulmonar.

Administración cutánea y transdérmica

En los últimos años, se han comercializado algunos productos de aplicación en cosmética, basados en las nanopartículas lipídicas (108). De hecho, de los denominados portadores lipídicos nanoestructurados, considerados como la segunda generación de nanopartículas lipídicas, se encuentran en el mercado mundial más de 20 productos relacionados con la cosmética.

Considerando que para los liposomas, éste fue también el primer paso previo a su entrada en el mercado farmacéutico para otras aplicaciones terapéuticas, la situación puede ser prometedora para las nanopartículas lipídicas. Se ha comprobado además, mediante nanopartículas fluorescentes, que éstas pueden penetrar en la piel, especialmente a través del espacio que rodea al folículo piloso, lo que ofrece grandes expectativas para el tratamiento del acné o patologías como la alopecia (70).

Recientemente se ha estudiado la posibilidad de que las nanopartículas lipídicas actuen como sistemas transdérmicos para moléculas como la melatonina (71). Los resultados demostraron la existencia de absorción significativa para dicha hormona cuando era aplicada tras su incorporación a nanopartículas lipídicas, que además conseguían mantener niveles significativos durante un período de 24 horas.

Administración ocular

Es una vía todavía poco explorada para la administración de nanopartículas lipídicas, pero sin embargo el estudio realizado por el grupo de Gasco y col. (73) con tobramicina tópica crea nuevas expectativas en este área. Destaca especialmente tanto el notable incremento observado en el AUC de las concentraciones de fármaco en humor acuoso, que se multiplicó por un factor de 4, así como en el tmáx, que se multiplicó por 8, en comparación a la administración del colirio comercial. El seguimiento de estas nanopartículas marcadas con fluo-

rescencia explica los buenos resultados obtenidos, ya que tanto la retención a nivel precorneal como a nivel del saco conjuntival se prolonga notablemente, lo que es crucial en este tipo de administración.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Bangham, A.D., Standish, M.M. & Watkins, J.C. (1965) Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13: 238-252.

(2) Perrie, Y. (2008) Gregory Gregoriadis: Introducing liposomes to drug delivery. *J. Drug Targ.* 16: 518-519.

(3) Fenske, D.B., Chonn, A. & Cullis, P.R. (2008) Liposomasl Nanomedicines : an emerging field. *Toxicologic Pathology.* 36: 21-29.

(4) Ehrlich, P. (1906) Collected studies on Immunology. John Wiley, New York, pp 442-447.

(5) Takeuchi, H., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H. & Kawashima, Y. (2005) Effectiveness of submicron-sized chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. *Int. J. Pharm.* 303: 160-170.

(6) Wu, Z.H., Ping, Q.N., Wei, Y. & Lai, J.M. (2004) Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposmes afeter oral administration in mice. *Acta Pharmacol. Sin.* 25: 966-972.

(7) Maurer, N., Fenske, D.B. & Cullis, P.R. (2001) Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1: 923-947.

(8) Simard, P., Leroux, J.C., Allen, C. & Meyer, O. (2007) Liposomes for drug delivery. En Nanoparticles for Pharmaceutical Applications. Domb AJ, Tabata Y, Ravi Kumar MNV (eds). American Scientific Publishers, Stevenson Ranch California, pp 1-62.

(9) El Magharaby, G.M., Barry, B.W. & Williams, A.C. (2008) Liposomas and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34: 203-222.

(10) Cevc, G. (1996) Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration and transdermal drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 13: 257-388.

(11) Azarmi, S., Roa, W.H. & Lobenberg, R. (2008) Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 863-875.

(12) Lian, T. & Ho, R. (2001) Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 90: 667-680.

(13) Saunders, L., Perrin, J. & Gammack, D.B. (1962) Ultrasonic irradiation of some phospholipid solutions. *J. Pharm. Pharmacol.* 14: 576-572.

(14) Kremer, J.M.H., Van de Esker, M.W.J., Pathmamanoharan, C. & Wiersema, P.H. (1977) Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry*. 16: 3932-35.

(15) Szoka, F. & Papahadjopoulos, D. (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng*. 9: 467-508.

(16) Szoka, F., Olson, F., Heath, T., Vail, W., Mayhew, E. & Papahadjopoulos, D. (1980) Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 microns) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biphys. Acta*. 601: 559-571.

(17) Talsma, H., Ozer, A.Y., Van Bloois, L. & Crommelin, D.J. (1989) The size reduction of liposome with a high pressure homogenizer (Microfluidizer): characterization of prepared dispersions and comparison with conventional methods. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 15: 197-207.

(18) Kirby, C. & Gregoriadis, G. (1984) Dehydration-rehydration vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology*. 2: 979-984.

(19) Li, C. & Deng, Y. (2004) A novel method for the preparation of liposomes: freeze drying of monophase solutions. *J. Pharm. Sci*. 93: 1403-1414.

(20) Storm, G. & Crommelin, D.J.A. (1998) Liposomes: quo vadis? *Pharm. Sci. Technol. Today*. 1: 19-31.

(21) Klibanov, A.L., Maruyama, K., Beckerleg, A.M., Torchilin, V.P. & Huang, L. (1990) Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong circulation time in liposomes. *FEBS Lett*. 268: 235-237.

(22) Senior, J., Delgado, C., Fisher, D., Tilcock, C. & Gregoriadis, G. (1991) Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma proteins and clearance from the circulation: studies with polyethyleneglycol-coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*. 1062: 77-82.

(23) Immordino, M.L., Dosio, F. & Cattel, L. (2006) Stealth liposomes: review of the basic science, rationale and clinical applications; existing and potential. *Int. J. Nanomed*. 1: 297-315.

(24) Torchilin, V.P., Trubetskoy, V.S., Whitemen, K.R., Calceti, P., Feruti, P. & Veronese, F.M. (1995) New synthetic amphiphilic polymers for the steric protection of liposomes in vivo. *J. Pharm. Sci*. 84: 1049-1053.

(25) Lasic, D.D. & Templeton, N.S. (1996) Liposomes in gene therapy. *Adv. Drug Deliv, Rev.* 20: 221-266.

(26) Torchilin, V.P. (2006) Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu. Rev. Biomed. Eng*. 8: 343-375.

(27) Schnyder, A., Krahenbuhl, S., Torok, M., Drewe, J. & Huwyler, J. (2004) Targeting of skeletal muscle in vitro using biotinylated immunoliposomes. *Biochim. J.* 377: 61-67.

(28) Portney, N.G. & Ozkan, M. (2006) Nano-oncology: drug delivery, imaging and sensing. *Annal. Bioanal. Chem.* 384: 620-630.

(29) Torchilin, V.P. (2005) Recent advances with lipomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discovery*. 4: 145-160.

(30) Allen, T.M. & Cullis, P.R. 2004. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*. 303: 1818-1822.

(31) Andresen, T.L., Jensen, S.S. & Jorgensen, K. (2005) Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospect of active and tumor specific drug release. *Prog. Lipid Res.* 44: 68-97.

(32) Torrado, J.J., Espada, R., Ballesteros, M.P. & Torrado-Santiago, S. (2008) Amphotericin B formulations and drug targeting. *J. Pharm. Sci.* 97: 2405-2425.

(33) Walsh, T.J., Yeldandi, M., McEvoy, M., Gonzalez, C., Chanock, S., Freijeld, A., Seibel, N.I., Whitcomb, P.O., Jarosinski, P., Boswell, G., Bekersky, I., Alak, A., Buell, D., Barret, J. & Wilson, W. (1998) Safety, tolerance and pharmacokinetics of small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (Ambisome) in neutropenic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2391-2398.

(34) Désormaux, A. & Bergeron, M.G. (2005) Lymphoid tissue targeting of anti-HIV drugs using liposomes. *Methods Enzymol.* 391: 330-351.

(35) Gagné, J.F., Désormaux, A., Perron, S., Tremblay, M.J. & Bergeron, M.G. (2002) Targeted delivery of indinavir to HIV-1 promary reservoirs with immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1558: 198-210.

(36) Feldmann, M., Brennan, F.M. & Maini, R.N. (1996) Rheumathoid Arthritis. *Cell.* 85: 307-310.

(37) Tran, C.N., Lundy, S.K. & Fox, D.A. (2005) Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 12: 183-189.

(38) Vanniasinghe, A.S., Bender, V. & Manolios, N. The potential of liposomes drug delivery for the treatment of inflammatory arthritis. *Sem. Arthrit. Reuma.* En prensa. doi: 10.1016/j.semarthrit.2008.08.004.

(39) Lee, L., Buckley, C., Blades, M.C., Panay, G., George, A.J. & Pitzalis, C. (2002) Identification of synovium-specific homing peptides in vivo phage display section. *Arthritis Rheum.* 46: 2109-2120.

(40) Gaspar, M.M., Bakowsky, U. & Ehrhardt, C. (2008) Inhaled liposomes. Current strategies and future challenges. *J. Biomed. Nanotechnol.* 4: 1-13.

(41) Zaru, M., Mourtas, S., Klepetsanis, A., Fadda, A.M. & Antimisiaris, S.G. (2007) Liposomes for drug delivery to the lung by nebulization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67: 655-666.

(42) Bridges, P.A. & Taylor, K.M. (1998) Nebulisers for the generation of liposomal aerosols. *Int. J. Pharm.*173: 117-125.

(43) Wong, J.P., Yang, H.M., Blasetti, K.L., Schnell, G., Conley, J. & Schofield, L.N. (2003) Liposome delivery of ciprofloxacin against intracellular *Francisella tularensis* infection. *J. Control. Release*. 92: 265-273.

(44) Clark, J.M., Whitney, R.R., Olsen, S.J., George, R.J., Swerdel, L., Kunselman, L. & Bonner, D.P. (1991) Amphotericin-B lipid complex therapy of experimental fungal- infections in mice. *Antimicrobial Agents Chemother*. 35: 615-621.

(45) Leemans, J.C., Juffermans, N.P., Florquin, S., Van Rooijen, N., Vervoordeldonk, M.J., Verbon, A., Van Derenter, S.J.H. & Van der Poll, T. (2001) Depletion of Alveolar Macrophages Exerts Protective Effects in Pulmonary Tuberculosis in Mice. *J. Immunol*. 166: 4604-4611.

(46) Chono, S., Tanino, T., Seki, T. & Morimoto, K. (2007) Uptake characteristics of liposomes by rat alveolar macrophages: influence of particle size and surface mannose modification. *J. Pharm. Pharmacol.* 59: 75-80.

(47) Khanna, C., Hasz, D.E., Klausner, J.S. & Anderson, P.M. (1996) Aerosol delivery of interleukin-2 lipoosmes is non toxic and biologically effective: canine studies. *Clin. Cancer Res*. 2: 721-734.

(48) Khanna, C., Anderson, P.M., Hasz, D.E., Katsanis, E., Neville, M. & Klausner, J.S. (1997) Interleukin2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases. *Cancer*. 79: 1409-1421.

(49) Verschraegen, C.F., Gilbert, B.E., Loyer, E., Huaringa, A., Walsh, G., Newman, R.A. & Knight, V. (2004) Clinical evaluation of the delivery and safety of aerosolized liposomal 9-nitro-20(S)-camptothecin in patients with advanced pulmonary malignancies. *Clin. Cancer Res*. 10: 2319-2326.

(50) Laube, B.L. (2005) The expanding role of aerosols in systemic drug delivery, gene therapy and vaccination. *Respir. Care*. 50: 1161-1176.

(51) Huang, Y.Y. & Wang, C.H. (2006) Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. *J. Control Release*. 113: 9-14.

(52) Kaur, I.P., Garg, A., Singla, A.K. & Aggarwal, D. (2004) Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *Int. J. Pharm*. 269: 1-14

(53) Reddy, I.K. & Ganesan, M.G. (1996) Ocular therapeutics and drug delivery: a multidisciplinary approach. Technomic Publishing Company.

(54) Sanchez, A. & Alonso, M.J. (2006) Nanoparticular carriers for ocular drug delivery. En: Nanoparticulates as drug carriers. Wei K (ed). World Scientific Imperial College Press.

(55) Al-Muhammed, J., Ozer, A.Y., Ercan, M.T. &, Hinkal, A.A. (1996) In vivo estudies on dexamethasone sodium phosphate liposomes. *J. Microencapsul*. 13: 293-306.

(56) Ebrain, S., Peyman, G.A. & Lee, P.J. (2005) Applications of liposomes in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol*. 50: 167-182.

(57) Dean, D.A., Byrd, J.N. & Dean, B.S. (1999) Nuclear targeting of plasmid DNA in human corneals cells. *Curr. Eye Res*. 19: 66-75.

(58) Bochot, A., Couvreur, P. & Fattal, E. (2000) Intravitreal administration of antisense oligonucleotides: potential of lipomal delivery. *Prog. Retin. Eye Res*. 19: 131-147.

(59) Gasco, M.R. (1993) Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. U.S. Patent No 5.250.236.

(60) Müller, R.H. & Lucks, J.S. (1996) Arneistoffträger aus festen lipidteilchen, feste lipidnanosphären (SLN)/ Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN). European Patent EP 0605497 B1.

(61) Gasco, M.R. (2007) Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 59: 377-378.

(62) Manjunath, K., Reddy, J.S. & Venkateswarlu, V. (2005) Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol*. 27: 127-144.

(63) García-Fuentes, M., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. *Int. J. Pharm*. 296: 122-132.

(64) Wissing, S.A., Kaiser, O. & Müller, R.H. (2004) Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 56: 131-155.

(65) Shenoy, V.S., Vijay, I.K. & Murthy, R.S.R. (2005) Tumor targeting: biological factors and formulations advances in injectable lipid nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol*. 57: 127-144.

(66) Wong, H.L., Bendayanm R., Rauthm A.M., Lim Y. & Wu, X.Y. (2007) Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 59: 491-504.

(67) Hu, L., Tang, X. & Cui, F. (2004) Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol*. 56: 1527-1535.

(68) Muchow, M., Maincent, P. & Müller, R.H. (2008) Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for oral drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm*. 34: 1394-1405.

(69) Müller, R.H., Radtke, M. & Wissing, S.A. (2002) Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 54: 131-155.

(70) Wissing, S. & Müller, R.H. (2002) Solid lipid nanoparticles as carriers for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J. Control. Rel*. 81: 225-233.

(71) Priano, L., Esposti, D., Esposti, R., Castagna, G., De Medici, C., Fraschini, F. & Gasco, M.R. (2007) Solid lipid nanoparticles incorporating melatonin as new model for sustained oral and transdermal delivery systems. *J. Nanosci. Nanotechnol*. 7: 1-6.

(72) Videira, M.A., Botelho, M.F., Santos, A.C., Gouveia, L.F., Pedroso de Lima, J.J. & Almeida, A.J. (2002) Pulmonary delivery of SLN as a coloidal drug carrier system to the lung lymphatics. *J. Drug Target*. 10: 607-613.

(73) Cavalli, R., Gasco, M.R., Chetoni, P., Burgalassi, S. & Saettone, M.F. (2002) Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int. J. Pharm*. 238: 241-245.

(74) Westensen, K., Bunjes, H. & Koch, M.H.J. (1997) Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J. Control Rel*. 48: 223-236.

(75) Müller R.H., Mäder K., Lippacher A. & Jenning V. (2000) Fest-flüssige (halbfeste) Lipidpartikel und Verfahren zur Herstellung hochkonzentrierter Lipidpartikeldispersionen. PCT application PCT/EP00/04565.

(76) Müller R.H., Mehnert W., Lucks J.S., Schwarz J.S., zur Mühlen, A., Weyhers, H., Freitas, C. & Rühl, D. (1995) *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 41: 62-69.

(77) Sjöström, B. & Bergenstahl (1992) Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions, I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int. J. Pharm*. 88: 53-62.

(78) Saraf, S., Mishra, D., Asthana, A., Jain, R., Singh, S. & Jain, N.K. (2006) Lipid nanoparticles for mucosal immunization against hepatitis B. *Vaccine*. 24: 45-56.

(79) García-Fuentes, M., Torres, D. & Alonso, M.J. (2002) Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Coll. Surf. B. Biointerf*. 27: 159-168.

(80) Trotta, M., Cavalli, R., Carlotti, M.E., Battaglia, L. & Debernardi, F. (2005) Solid lipid micro-particles carrying insulin formed by solvent-in-water emulsion-diffusion technique. *Int. J. Pharm*. 288: 281-288.

(81) Hu, F.Q., Hong, Y. & Yuan, H. (2004) Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *Int. J. Pharm*. 273: 29-35.

(82) Blasi, P., Giovagnoli, S., Schoubben, A., Ricci, M. & Rossi, C. (2007) Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 59: 454-477.

(83) Yang, S.C., Lu, L.F., Cai, Y., Zhu, J.B., Liang, B.W. & Yang, C.Z. (1999) Body distribution in mice of intravenously injected M.R. (2002). Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin loaded lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and in other tissues. *J. Drug Target*. 10: 327-335.

(84) Zara, G.P., Cavalli, R., Fundarò, A., Bargoni, A., Caputo, O. & Gasco, M.R. (1999) Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN). *Pharm. Res*. 40: 281-286.

(85) Zara, G.P., Cavalli, R., Bargoni, A., Fundarò, A., Vighetto, D. & Gasco, M.R. Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and other tissues. *J. Drug Target*. 10: 327-335.

(86) Fundarò, A., Cavalli, R., Bargoni, A., Vighetto, D., Zara, G.P. & Gasco, M.R. (2000) Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after IV administration to rats. *Pharm. Res*. 42: 337-343.

(87) Reddy, L.H., Sharma, R.K., Chuttani, K., Mishra, A.K. & Murthy, R.S.R. (2005) Influence of administration route on tumour uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton´s lymphoma tumor bearing mice. *J. Control. Rel*. 105: 185-198.

(88) Serpe, L., Catalano, M.G., Cavalli, R., Ugazio, E., Bosco, O., Canaparo, R., Muntoni, E., Frairia, R., Gasco, M.R., Eandi, M. & Zara, G.P. (2004) Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 58: 673-680.

(89) Wong, H.L., Rauth, A.M., Bendayan, R., Manias, J.L., Ramaswamy, M., Liu, Z., Erhan, S.Z. & Wu, X.Y. (2006) A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug resistant human breast cancer cells. *Pharm. Res*. 23: 1574-1585.

(90) Wong, H.L., Bendayan, R., Rauth, A.M., Xue, H.Y., Babakhanian, K. & Wu, X.Y. (2006) A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) system. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 317: 1372-1381.

(91) Wong, H.L., Rauth, A.M., Bendayan, R. & Wu, X.Y. (2007) *In vivo* evaluation of a new polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) formulation of doxorubicin in a murine solid tumor model. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 65: 300-308.

(92) Minagawa, T., Sakanaka, K., Inaba, S.I., Sai, Y., Tamai, I., Suwa, T. & Tsuji, A. (1996) Blood-brain-barrier transport of lipid microspheres containing clinprost, a prostaglandin 12 analogue. *J. Pharm. Pharmacol*. 48: 1016-1022.

(93) Podio, V., Zara, G.P., Carazzone, M., Cavalli, R. & Gasco, M.R. (2000) Biodistribution of stealth and non-stealth solid lipid nanospheres after intravenous administration to rats. *J. Pharm. Pharmacol*. 52: 1057-1063.

(94) Harivardhan, L., Reddy, L.H., Sharma, R.K., Chuttani, K., Mishra, A.K. & Murthy, R.S.R. (2004) Etoposide-incorporated tripalmitin nanoparticles with different surface charge: formulation, characterization, radiolabeling and biodistribution studies. *AAPS J*. 6 (Article 23, http:// www.aapsj.org)

(95) Manjunath, K. & Venkateswarlu, V. (2005) Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal admininistration. *J. Control Rel*. 107: 215-228.

(96) Lockman, P.R., Koziara, J.M., Mumper, R.J. & Allen, D.D. (2004) Nanoparticle surface changes alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J. Drug Target*. 12: 635-641.

(97) Charman, W.N. (2000) Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging conceps. *J. Pharm. Sci*. 89: 967-978.

(98) Porter, C.J. & Charman, W.N. (2001) Intestinal lymphatic drug transport: An update. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 50: 61-80.

(99) Khoom S.M., Shacklefordm D.M., Porterm C.J., Edwardsm G.A. & Charmanm W.N. (2003) Intestinal lymphatic trnaspot of halofantrine occurs after oral administration of a unit-dose lipid-based formulation to fasted dogs. *Pharm. Res*. 20: 1460-1465.

(100) Bargoni, A., Cavalli, R., Caputo, O., Fundarò, A., Gasco, M.R. & Zara, G.P. (1998) Solid lipid nanoparticles in lymph and plasma after duodenal administration to rats. *Pharm. Res*. 15: 745-750.

(101) Cavalli, R., Zara, G.P., Caputo, O., Bargoni, A., Fundarò, A. & Gasco, M.R. (2000) Transmucosal transport of tobramycin incorporated in solid lipid nanoparticles (SLN) after duodenal administration. Part I- a pharmacokinetic study. *Pharmacol. Res*. 42: 541-545.

(102) Bargoni, A., Cavalli, R., Zara, G.P., Fundarò, A., Caputo, O. & Gasco, M.R. (2001) Transmucosal transport of tobramycin incorporated in solid lipid nanoparticles (SLN) after duodenal administration. Part II- tissue distribution. *Pharmacol. Res*. 43: 497-502.

(103) Pandey, R., Sharma, S. & Khuller, G.K. (2005) Oral solid lipid nanoparticle- based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis*. 85: 415-420.

(104) Yang, S.C., Zhu, J.B., Lu, Y., Liang, B.W. & Yang, C.Z. (1999) Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *Pharm. Res*. 16: 751-757.

(105) García-Fuentes, M. (2004) Nanopartículas lipídicas modificadas con polímeros hidrófilos: desarrollo y evaluación de su potencial como sistemas transportadores de péptidos a nivel intestinal. Universidad de Santiago de Compostela.

(106) García-Fuentes, M., Prego, C., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethyleneglycol) as carriers for oral calcitonin delivery. *Eur. J. Pharm. Sci*. 25: 133-143.

(107) Videira, M., Gano, L., Santos, A.C., Neves, M. & Almeida, A.J. (2006) Lymphatic uptake of lipid nanoparticles following endotracheal administration to rats. *J. Microencapsul*. 23: 855-862.

(108) Müller, R.H., Rimpler, C., Petersen, R., Hommoss, A. & Schwabe, K. (2007) A new dimension in cosmetic products by nanostructured lipid carriers (NLC) technology. *Eur. Cosmet*. 15: 32-37.

5. Dendrímeros y sus aplicaciones biomédicas

TERESA GONZALO Y M.ª ÁNGELES MUÑOZ-FERNÁNDEZ

Laboratorio de InmunoBiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

¿QUÉ SON LOS DENDRÍMEROS?

Los dendrímeros son moléculas poliméricas, versátiles y tridimensionales de síntesis química con forma bien definida, tamaño nanoscópico y con propiedades físico-químicas que recuerdan a las de las biomoléculas (Figura 5.1). Los dendrímeros han recibido gran atención en los últimos años debido a su posible utilización en aplicaciones tan variadas como catálisis a nanoescala, sensores químicos, micelas unimoleculares, imitación de la función de las enzimas, encapsulación de moléculas, reconocimiento molecular, agentes de diagnóstico y también como vehículos para el transporte de genes y fármacos.

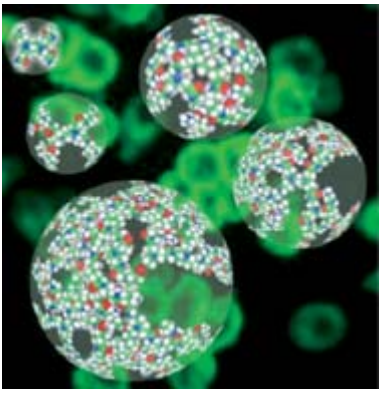


FIGURA 5.1. *Imágenes generadas por ordenador de nanopartículas. Imagen cortesía del Centro Nacional de Nanotecnología Biológica (Center for Biologic Nanotechnology), Universidad de Michigan-Ann Arbor.*

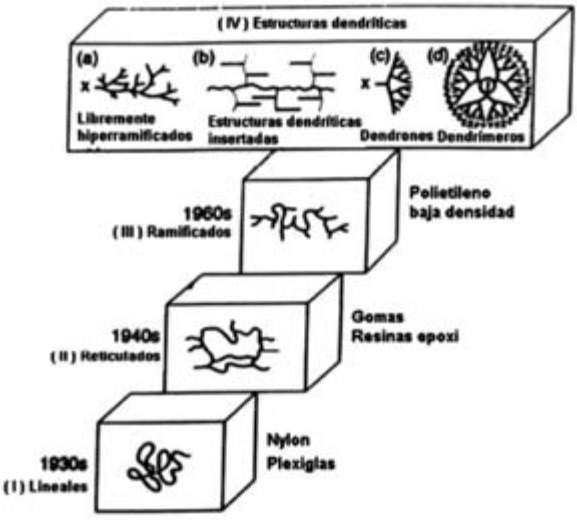


FIGURA 5.2. *La estructura de los polímeros tradicionales (clases I a III) ha conducido a las estructuras dendríticas o clase IV en las que agrupan cuatro subclases de polímeros.*

El término «dendrímero» procede del griego «dendron» que significa «árbol» o «rama», y el sufijo «mero», que significa «segmento» (1). Otro nombre que reciben los dendrímeros es el de «arboroles» (2), por su semejanza con las raíces de los árboles, con las dendritas de las neuronas, son conocidos también como árboles moleculares.

Estas moléculas híper-ramificadas presentan la ventaja de ser modificadas para presentar un grupo funcional deseado de forma multivalente, de forma que incremente sinérgicamente su acción. En química orgánica sintética, las estructuras dendríticas se consideran actualmente como la cuarta generación o clase de la arquitectura macromolecular que ha ido desarrollándose desde los primeros polímeros, en la década de los años treinta, hasta la actualidad (Figura 5.2) emergiendo como una nueva clase de polímeros llamados moléculas «en cascada», y desarrolladas por Vötgle y su grupo (3).

Más tarde, el desarrollo de estos diseños moleculares junto con el avance de las técnicas sintéticas dieron lugar al desarrollo de estructuras dendríticas más grandes, que fueron denominadas «dendrímeros» (4-6).

Los dendrímeros, que se engloban dentro del nivel nanoscópico (Figura 5.3), son moléculas con estructura bien definida y con baja polidispersidad en comparación con los polímeros tradicionales. A nivel molecular, la estructura rami-

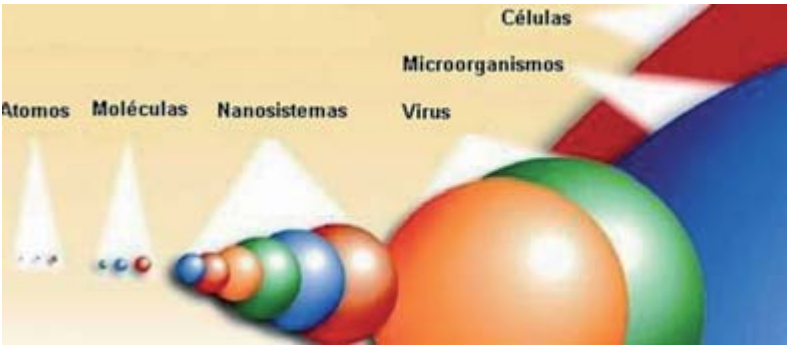


FIGURA 5.3. *Niveles atómicos, molecular y nanoscópicos en comparación con tamaños virales, microbiológicos y celulares.*

ficada origina en general estructuras semiglobulares o globulares, la mayoría con una alta densidad de grupos funcionales en su superficie junto con un volumen molecular «pequeño».

Los dendrímeros de mayor generación ocupan un volumen hidrodinámico menor comparado con los polímeros lineales, debido a su estructura globular. Sin embargo, en comparación con las proteínas, los dendrímeros presentan un mayor volumen hidrodinámico.

Para conocer mejor estas moléculas, se expone a continuación una amplia revisión acerca de distintos aspectos de la química y las aplicaciones biomédicas de las mismas desde una perspectiva histórica.

La estructura dendrimérica está caracterizada por «capas» entre cada punto focal llamadas «generaciones». La definición exacta del término «generación» ha sido objeto de controversia, aceptándose generalmente el número de puntos focales (o puntos «cascada») que aparecen desde el core (núcleo central) hasta la superficie. Un dendrímero de generación 5 presenta por tanto 5 puntos focales entre el núcleo y la superficie. El núcleo es denominado a veces «generación cero» (G0), ya que no presenta ningún punto focal. En los dendrímeros tipo polipropilen-imina (PPI), el núcleo es 1,4-diaminobutano; para los dendrímeros poliamidoamina (PAMAM), el núcleo es bien amonio o bien 1,2 etilendiamina (Figura 5.4). En el caso de los PAMAM, los compuestos intermedios que presentan grupos carboxilato en superficie se denominan dendrímeros de «media generación» (ejemplo: G1.5 o G2.5).

El diseño de los dendrímeros puede estar basado en una gran variedad de grupos funcionales, como las poliaminas en el caso de los PPI (3), por una mez-

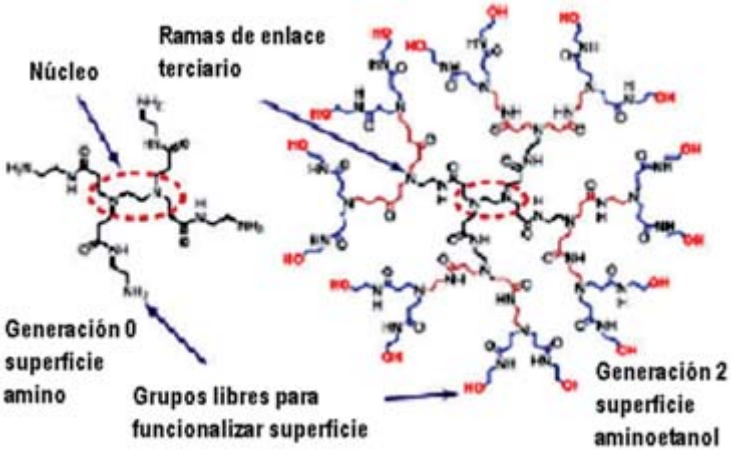


FIGURA 5.4. *Dendrímero PAMAM generación 2, con un núcleo de etilendiamina (2 carbonos), y superficie amidoetanol. Adaptado de la web de Dendritech y Sigma-Aldrich. http://www.dendritech.com; http://www.sigmaaldrich.com*

cla de aminas y poliamidas, como los PAMAM (5) o estar constituidos por subunidades poli(aril éter) más hidrofóbicas (7). Otros ejemplos son los diseños basados en núcleos de carbohidratos (8) o de fósforo (9), o de calixarene (10).

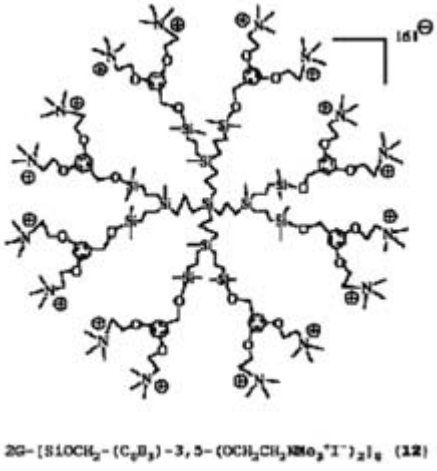


FIGURA 5.5. *Dendrímero carbosilano (CBS) generación 2, con un núcleo de silicio y superficie terminal de aminas (11).*

Recientemente, se han sintetizado unos dendrímeros conteniendo elementos como silicio, así llamados carbosilanos (CBS) (Figura 5.5) (11). Los dendrímeros dependiendo del grupo funcional que presentan en la periferia, pueden ser neutros o con carga (catiónicos o aniónicos) que pueden proveerle de diferentes características y funciones.

SÍNTESIS QUÍMICA, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS DENDRÍMEROS

Las estructuras dendríticas son sintetizadas en base a dos aproximaciones diferentes, síntesis divergente o convergente. En la aproximación divergente, el dendrímero es sintetizado desde el núcleo como punto de inicio y crecido generación a generación hasta la superficie. Sin embargo, el elevado número de reacciones que tienen que llevarse a cabo sobre una única molécula (con muchos sitios equivalentes de reacción), requiere unas transformaciones muy efectivas (con un rendimiento en torno al 99%) para evitar defectos. Incluso para transformaciones por generación muy eficaces el rendimiento de un dendrímero PPI «perfecto» será sólo aproximadamente del 25% por el método divergente (12). La alternativa de síntesis convergente desarrollada por Hawker y Frechet (13) comienza desde la superficie y finaliza en el núcleo, donde los segmentos de dendrímero (o dendrones) son acoplados todos juntos. En la aproximación convergente, solamente un pequeño número de sitios reactivos son funcionalizados en cada paso, dando lugar a un menor número de defectos, aumentando así el rendimiento. Cada generación sintetizada puede por tanto ser purificada, a pesar de que en los dendrímeros de gran generación esta tarea es más difícil, por las grandes similitudes entre los reactantes y el producto formado. Sin embargo, con una purificación apropiada en cada paso, se pueden obtener dendrímeros sin defectos por la alternativa convergente.

Al crecer la estructura dendrimérica, aparecen varios compartimentos. La estructura se divide así en tres partes:

- La superficie multivalente, con un alto número de sitios reactivos potenciales.
- El armazón externo, justo por debajo de la superficie con un microambiente protegido de la parte externa por la superficie dendrimérica.
- El núcleo, que en los dendrímeros de alta generación está protegido de las capas circunvalantes, creando un microambiente rodeado por las ramas dendríticas.

TABLA 5.1. *Impacto en el peso molecular y en el tamaño de los dendrímeros PAMAM según crece la generación. Adaptado de la web de Dendritech. http://www.dendritech.com.*

PAMAM dendrímeros Generación	Peso Molecular	Diámetro en nanómetros (nm)	Grupos en superficie
0	517	1,5	4
1	1,430	2,2	8
2	3,256	2,9	16
3	6,909	3,6	32
4	14,215	4,5	64
5	28,826	5,4	128
6	58,048	6,7	256
7	116,493	8,1	512
8	233,383	9,7	1024
9	467,162	11,4	2048
10	934,720	13,5	4096

El interior es por tanto un lugar con potencial para encapsular moléculas-huésped. Las tres partes del dendrímero pueden ser adaptadas específicamente para el propósito deseado (lograr sensores dendríticos, vehículos para fármacos, etc.). Por otra parte, la superficie multivalente de los dendrímeros de alta generación puede contener un alto número de grupos funcionales. Esto hace también a las superficies dendríticas y al armazón externo zonas con posibilidad de interacción con moléculas del huésped. En la Tabla 5.1 se puede observar el impacto en el tamaño del dendrímero PAMAM a medida que aumenta su generación.

Tras la aparición de los dendrímeros se sugirió que la nanoestructura tridimensional de los dendrímeros de mayor generación haría a estas estructuras similares en cierta forma a las proteínas (14). Sin embargo, a diferencia de las proteínas, que consisten en cadenas polipeptídicas plegadas, la estructura poli-ramificada del interior de los dendrímeros está mayoritariamente formada por enlaces covalentes, resultando de alguna manera en una estructura menos flexible.

Además, un dendrímero es en promedio menos compacto que una proteína (el interior no está compactado tan eficientemente como en una proteína); por último, el dendrímero contiene un número sustancialmente mayor de grupos funcionales en la superficie que una proteína de un peso molecular similar.

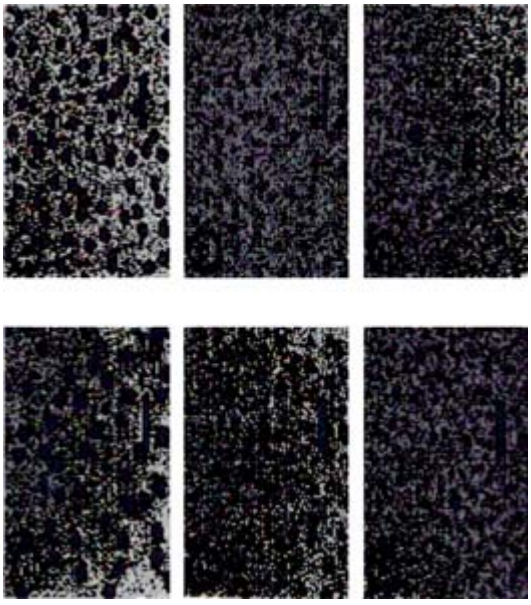


FIGURA 5.6. *Dendrímeros de PAMAM teñidos positivamente con una solución acuosa al 2% de ácido fosfotúngstico y detectado por microscopía TEM. Dendrímero de diferentes generaciones a) G10; b)G9; c)G8; d) G7; e)G6; f) G5. La escala indica 50 nm. Para G6 y G5, una cantidad de G10 se ha añadido como comparación. Adapted with permission from Jackson y colaboradores (14). Copyright 1998 American Chemical Society.*

La técnica de TEM (Transmission Electronic Microscopy) mediante un haz de electrones altamente energéticos, permite entonces obtener una imagen individual de un dendrímero, dando información directa de tamaño, forma, polidispersión y alineamiento de las moléculas. El grupo de Jackson y colaboradores (15), consiguieron visualizar con éxito diferentes generaciones del dendrímero PAMAM utilizando esta técnica (Figura 5.6).

Estudios de dinámica molecular llevados a cabo por varios grupos muestran que los dendrímeros, de forma similar a las proteínas, pueden adoptar una forma nativa (más compacta) o desnaturalizada (extendida), dependiendo de la polaridad, la fuerza iónica y el pH del solvente (Figura 5.7). Los dendrímeros PPI y PAMAM que contienen aminas primarias en su superficie muestran conformaciones extendidas a pH ácido debido a las repulsiones electrostáticas entre las aminas terciarias protonadas del interior y entre las aminas primarias de la superficie (16). A pH > 9, se produce un plegamiento como consecuencia de los puentes de hidrógeno entre las aminas terciarias interiores y las primarias de la superficie, resultando en un núcleo más denso.

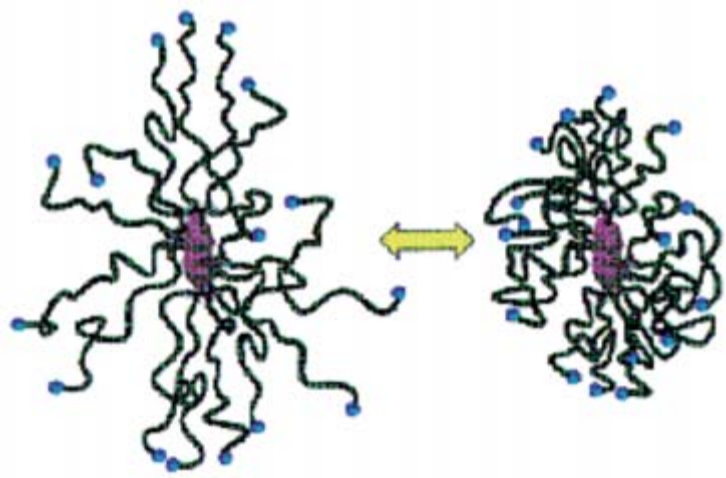


FIGURA 5.7. *Simulación de comportamiento de solubilidad de dendrímeros de PAMAM frente a pH ácido (izquierda) y su plegamiento y compactación a pH básico (derecha).*

SIGNIFICACIÓN DE LA MULTIVALENCIA EN LAS INTERACCIONES BIOLÓGICAS

En la Naturaleza nos podemos encontrar con muchos ejemplos de interacciones multivalentes, desde las uniones divalentes de los anticuerpos y de muchos receptores biológicos hasta las interacciones multivalentes de las patas de la salamanquesa que se cuentan por millones (18). La multivalencia ha demostrado conllevar una actividad incrementada comparando con las interacciones univalentes. El aumento sinergístico de una actividad (ej. de una actividad catalítica, o de la afinidad de una unión, etc.) de un sistema multivalente respecto a uno monovalente es denominado «efecto dendrítico» (8), (19). El efecto dendrítico es atribuido a una acción cooperativa en un sistema multivalente que resulta en un efecto mayor que el que correspondería a la valencia del sistema (efecto aditivo). La multivalencia puede incrementar además la especificidad de una interacción dada (20), esencialmente incrementando la afinidad por el ligando. Los sistemas biológicos están repletos de ejemplos de interacciones multivalentes (21), y esto puede ser debido a que las interacciones multivalentes proveen de:

- Un incremento en la fuerza de unión en uniones de baja afinidad respecto a los ligandos simples.
- Interacciones célula-célula más eficientes.

Los factores que pueden jugar un papel en estas interacciones incluyen obviamente la geometría de los ligandos y la flexibilidad de su unión al dendrímero (22). Los dendrímeros tienen por tanto el potencial de imitar la multivalencia de algunos sistemas biológicos de una manera muy bien definida.

CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DE LOS DENDRÍMEROS EN BIOMEDICINA

Para poder utilizar un dendrímero en biomedicina, éste debe cumplir varias condiciones de importancia crucial:

- No ser tóxicos.
- No inmunogénicos (excepto para vacunas).
- Atravesar barreras biológicas: barrera hematoencefálica, membranas celulares, intestino, pared vascular…
- Ser estables y permanecer en circulación el tiempo necesario para tener el efecto clínico buscado.
- Ser capaz de dirigirse a dianas específicas.

Toxicidad

No sólo los dendrímeros catiónicos, también las macromoléculas catiónicas en general, causan desestabilización de la membrana celular induciendo lisis celular (23). El mecanismo exacto de la citotoxicidad causada por estas estructuras no se conoce completamente. Inicialmente, estudios comparativos de citotoxocidad sobre diferentes líneas celulares concluyeron que los PAMAM amino-terminados (Starbust®) presentaban una menor citotoxicidad que los dendrímeros basados en lisina. Sin embargo, cuando los PAMAM fueron ensayados sobre células de adenocarcinoma humano Caco-2 (24, 25), mostraron una toxicidad importante. La toxicidad demostró ser dependiente de la generación, siendo los dendrímeros de mayor generación los más tóxicos (24, 25). Esto está de acuerdo con el hallazgo general de que los polímeros con mayor peso molecular son los que presentan una mayor citotoxicidad (26). Además, los estudios de hematotoxicidad con los PAMAM amino terminados demostraron que dichos dendrímeros presentaban un efecto hemolítico sobre una solución de hematíes de rata que también se incrementaba con la generación del dendrímero (27). Estudios de miotoxicidad

sobre músculos de rata Sprague-Dawley mostraron que los PAMAM G4 amino terminados eran más miotóxicos que los liposomas y proteínas ensayados (28). Estudios sobre células de neuroblastoma en cultivo con distintas concentraciones de dendrímeros PEI, PPI y PAMAM durante una semana mostraron toxicidad de los dos últimos (29). Estudios recientes han demostrado que los PAMAM amino-terminados, con una estructura de mayor tamaño (por ejemplo grupos alquilo) presentan mayor toxicidad que los PAMAM con loa grupos amino libres.

Para los PPI amino terminados se ha encontrado un efecto similar de toxicidad generación dependiente (31). Como sucede para los PAMAM, los PPI con mayor generación han demostrado ser los más hemolíticos en hematíes de rata (27).

En resumen, los dendrímeros amino-terminados suelen ser citotóxicos (27). La citotoxicidad de los dendrímeros catiónicos puede ser debida a las interacciones entre la superficie catiónica del dendrímero y la superficie cargada negativamente de las membranas celulares, permitiendo a dichos dendrímeros adherirse a la superficie celular y dañarla, causando la lisis celular.

Sin embargo, los dendrímeros PAMAM con grupos carboxilato en su superficie (aniónicos) presentan una menor toxicidad que los dendrímeros catiónicos amino terminados, según estudios realizados en células Caco-2 (24). La toxicidad de los dendrímeros no está determinada solamente por la naturaleza de los grupos de superficie, sino también por la naturaleza química del esqueleto dendrimérico. Dendrímeros con esqueleto aromático poliéter con grupos carboxilato aniónicos en superficie han demostrado ser hemolíticos para hematíes de rata tras 24 horas de incubación. Pudiera ser que el interior aromático del dendrímero causara hemólisis debido a contactos hidrofóbicos con la membrana. (27). Se ha demostrado recientemente que los dendrímeros CBS con grupos aniónicos en la superficie (sulfonato o carboxilato) presentan una menor toxicidad que los mismos CBS con grupos funcionales catiónicos (32).

La utilización de aditivos puede reducir la citotoxicidad de forma importante en los dendrímeros amino-terminados. Por ejemplo, la adición al medio de cultivo de suero de ternera fetal reduce la toxicidad de dendrímeros PAMAM modificados con el fluoróforo *Oregon-Green* sobre células de carcinoma humano HeLa respecto al PAMAM sólo (33). Además, la toxicidad de los PAMAM disminuye cuando forman complejos con ADN (34, 35). Lo mismo ocurre para los PPI y para los CBS (36, 37). Esto indica que la unión no covalente entre los dendrímeros y el ADN, ARN o las proteínas lleva a un efecto de atenuación del policatión, similar al que se obtiene por modificación covalente de las aminas de superficie. Sin embargo, estas observaciones son contradichas por

otros estudios de citotoxicidad de complejos entre policationes y ADN (38). Estos estudios muestran la misma o mayor toxicidad cuando un dendrímero no modificado PAMAM se une a ADN; en este caso, la toxicidad no puede ser atribuída a la carga electrostática de superficie, sino a la gran cantidad de ADN introducido en las células por el dendrímero, lo cual puede llevar a apoptosis (39).

La toxicidad de los dendrímeros depende en gran medida de las líneas celulares sobre las que se ensayen, existiendo unas líneas más sensibles que otras. Los cultivos primarios así mismo son en general más sensibles a la toxicidad ante cualquier desafío con una droga que las líneas de cultivo establecidas o inmortalizadas.

Sólo hay unos pocos estudios acerca de la toxicidad de los dendrímeros *in vivo*. En general, la inyección en ratones de concentraciones de 10 mg kg^{-1} de PAMAM hasta generación 5 no parecen ser tóxicas, independientemente de si presentan modificaciones o no en la superficie (26, 40). Es más, la inyección de PAMAM no modificados junto con ovoalbúmina en ratones no fue tóxica *in vivo* (no se observó pérdida de peso, ni formación de granulomas, ni hemólisis o inflamación) (41). Nuevos dendrímeros poliesteres con terminaciones hidróxido o metóxido han demostrado no ser tóxicos tanto *in vitro* como *in vivo* (42, 43). A altas concentraciones (40 mg mL^{-1}) estos poliésteres inducen cierta inhibición del crecimiento celular *in vitro* pero no se observa mortalidad celular; cuando se inyectan en ratones, no se observaron fenómenos de toxicidad aguda ni a largo plazo. Las propiedades no tóxicas hacen de estos nuevos dendrímeros moléculas prometedoras biodegradables para el transporte de fármacos, ya que el dendrímero puede ser destruído por enzimas hidrolíticas después de la liberación del principio activo.

Inmunogenicidad

Los estudios sistemáticos iniciales realizados con dendrímeros PAMAM no modificados mostraron baja o ninguna inmunogenicidad de los dendrímeros de generaciones entre G3 y G7 (26, 41). Sin embargo, estudios posteriores mostraron algún grado de inmunogenicidad de estos dendrímeros encontrando que la modificación de los PAMAM aminoterminados con cadenas de polietilenglicol (PEG) reduce la inmunogenicidad y aumenta la semivida plasmática de los PAMAM en comparación con los PAMAM no modificados (44). Las cadenas de PEG aumentan la hidrofilia del dendrímero, creando una superficie altamente hidratada que induce pocas alteraciones con el microambiente fisiológico que le rodea. Por otro lado, la superficie del dendrímero puede ser modificada con antígenos o epítopos T dependientes creando compuestos altamente inmunogénicos, característica intrínseca en la creación de vacunas.

Capacidad de transfección y transvasación

Los dendrímeros pueden formar complejos con el ADN o ARN y transportar éste último al interior de las células, con menos daño en la membrana celular y menos efectos tóxicos comparados con los dendrímeros libres. Se han estudiado distintas aproximaciones para aumentar la capacidad de transfección de los complejos ADN-dendrímeros (dendriplexes) (35, 45). Los estudios de transfección *in vitro* mediante la adición de cantidades moderadas de beta-ciclodextrinas sulfonadas (BCD) concluyeron que se aumentaba la capacidad de transfección de los dendriplexes ADN-PAMAM, debido a la unión iónica entre los sulfonatos cargados negativamente de los BCD y los grupos catiónicos de los PAMAM, llevando a una modificación de la composición del complejo ADN-dendrímero (46). En los dendrímeros de polilisina, la eficacia de transfección se aumenta añadiendo en su superficie PEG; sin embargo, el porcentaje global de transfección con estos dendrímeros es bajo, probablemente por la liberación moderada de ADN desde los mismos (47). Las investigaciones concluyen generalmente en que la forma esférica de los dendrímeros no constituye una ventaja para el transporte de ADN al interior celular, mostrando los dendrímeros fragmentados por calor o la acción de detergentes una eficacia superior de transfección respecto a los no En cuanto a la capacidad de extravasación, estudios *in vivo* con los PAMAM demostraron que el tiempo de extravasación aumenta con el tamaño y el peso molecular de los dendrímeros (49). Estudios *in vitro* con epitelio intestinal de rata mostraron que la tasa de transferencia a través del epitelio de dendrímeros PAMAM fue más rápida que para otros polímeros estudiados, sugiriendo que estos dendrímeros pudieran ser utilizados en sistemas de transporte oral (50).

Aplicaciones biofarmacéuticas de los dendrímeros

El desarrollo de nuevos nano-polímeros biocompatibles se ha convertido en un importante objetivo de las compañías dedicadas a la Biotecnología. Las posibles aplicaciones biofarmacéuticas de estos nanopolímeros han demostrado ser múltiples:

- Transporte de fármacos, con el fin de aumentar la biodisponibilidad y la fracción activa de los mismos; liberación controlada de fármacos, con el fin de prolongar y/o distribuir mejor su efecto a lo largo del tiempo.
- En terapia génica: una de las facetas más estudiadas de estos nanopolímeros ha sido la relacionada con su potencial para el transporte de ADN, ARN, plásmidos al interior de las células.

- En vectorización de fármacos:como glico-transportadores.
- En administración transdérmica de fármacos (iontoforesis).
- Como *antivirales*, interfiriendo con el ciclo replicativo de virus y bacterias, postulándose su posible aplicación en dispositivos barrera para la prevención de enfermedades de transmisión sexual, como los microbicidas.
- Como antibacterianos.
- Como antitumorales.
- Como desnaturalizantes de proteínas.
- Como vacunas actuando como soporte estructural de péptidos antigénicos en el diseño de estrategias de vacunación.

Dendrímeros como transportadores de fármacos

Los dendrímeros de tipo PAMAM y PPI, con un gran peso molecular y superficies multivalentes, son macromoléculas con potencial aplicación en transporte de fármacos. La interacción con el fármaco puede tener lugar bien en las cavidades del núcleo dendrimérico (endo-receptor), bien en la superficie multivalente del armazón externo del dendrímero (exo-receptor). Un ejemplo de dendrímero endo-receptor es la «caja dendrítica» (51), donde un PPI G5 es modificado en superficie con grupos fenil-alanina, que protegen el armazón externo haciéndole más denso. Durante el proceso de crecimiento del dendrímero, se encapsulan en su interior moléculas de diferente tamaño. El dendrímero puede portar 4 moléculas grandes (Rosa de Bengala) y 8-10 pequeñas (ácido p-nitrobenzoico). Cuando este dendrímero se trata con ácido fórmico, el armazón exterior se abre permitiendo la liberación de las moléculas hospedadas en su interior.

Guadarrama y colaboradores elaboraron unos modelos dendriméricos para poder observar la localización de las moléculas de ibuprofeno y avermectina (Figura 5.8) para poder evaluar las interacciones entre el dendrímero y los fármacos por medio de cálculos de dinámica molecular (52).

Frechet propuso una micela unimolecular basada en una red dendrimérica de poliarileter con grupos carboxilato en superficie que era capaz de disolver moléculas apolares (7). Este tipo de dendrímeros serían buenos candidatos para el transporte de compuestos hidrofóbicos bioactivos, como los esteroides.

Mitchell y col. modificaron las aminas de superficie de los dendrímeros PAMAM con un derivado del glicerol (tris(hidroximetil)aminometano), creando

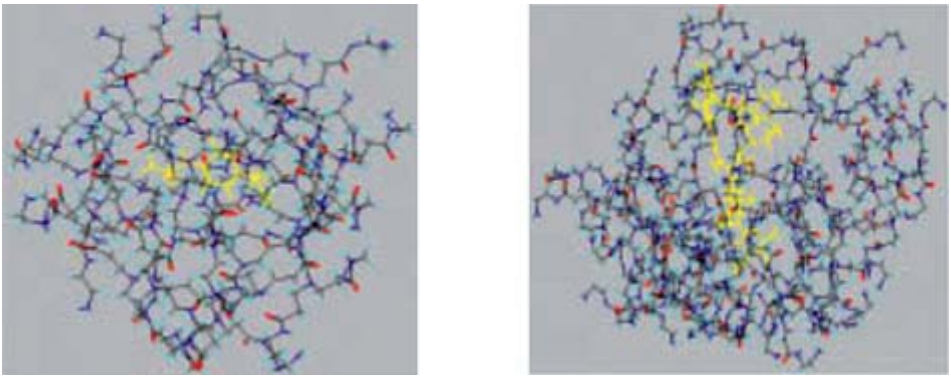


FIGURA 5.8. *Proceso de encapsulación del dendrímero PAMAM de tercera generación con las móleculas de ibuprofeno (derecha) y avermectina (izquierda) encapsulados en color amarillo (52).*

dendrímeros hidrosolubles capaces de unir compuestos aromáticos acídicos antibacterianos, los cuales pueden ser liberados cuando baja el pH (53).

Los dendrímeros de estructura carbosilano, CBS, hidrosolubles y biocompatibles desarrollados por Ortega y colaboradores (10) propiciaron nuevas investigaciones con estos dendrímeros en el transporte de fármacos polianiónicos, tales como la heparina, algunos antiinflamatorios no estroideos como la indometacina, ácido acetilsalicílico, etc, evitando los efectos indeseados de la unión de estos fármacos a proteínas del plasma o a RNasas (54). Debido a su labilidad a pH ácido, podrían ser útiles para la administración de fármacos aniónicos de forma pH dependiente (36, 55).

Dendrímeros en terapia génica

El interés de los dendrímeros como transportadores de fármacos se ha focalizado principalmente en su capacidad de transporte de ADN o ARN al interior de las células (transporte de genes o de secuencias cortas de ADN o ARN inhibidoras) en terapia génica sustitutiva o terapia antisentido. En este particular existen múltiples estudios con PAMAM o PPI amino-terminados no modificados como agentes de transfección no virales de ADN al núcleo (34, 35, 56-59).

Como se puede observar en la Figura 5.9, los dendrones se distribuyen a lo largo de su linearidad con las moléculas de DNA atrapadas alrededor de las cargas positivas del dendrón (60). Se ha encontrado que los dendrímeros parcialmente degradados o fragmentados presentan una mayor capacidad de transfec-

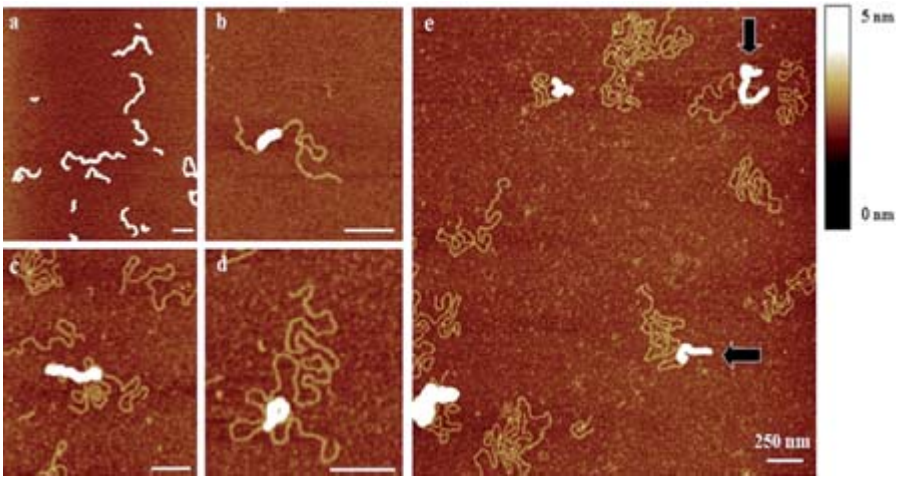


FIGURA 5.9. *Imágenes de dendrones con DNA complejado obtenidas mediante el microscopio electrónico de barrido (Scanning Force Microscopy). Las escala representa 250 nm. Adaptado con permiso de Gossl y colaboradores (60). Copyright 2002 American Chemical Society.*

ción; a esto se le llama «activación» del dendrímero, que puede ser por rotura hidrolítica de los puentes amida (48, 61, 62); en comparación con los dendrímeros intactos, los dendrímeros degradados parcialmente tienen una estructura más flexible (menos puentes amida) y forman una estructura más compacta con el ADN, lo cual favorece la transfección por vía endocítica (62). Además, la transfección es mayor con un exceso de aminas primarias del dendrímero frente a grupos fosfato del ADN, dotando al complejo de una carga total positiva, probablemente por favorecer la adhesión del complejo a la superficie celular, cargada negativamente. Los dendrímeros PPI de mayor generación (que no contienen amidas) son demasiado citotóxicos para ser usados como vehículos no virales, sin embargo los de baja generación pudieran ser una buena opción (31).

Los dendrímeros amino terminados no modificados transportan el ADN hasta la membrana y pueden ayudar al proceso de transfección induciendo disrupción de la misma. En teoría el ADN desnudo, cargado negativamente, sería repelido por la superficie externa celular, también cargada negativamente.

Por otro lado los dendrímeros CBS pueden tener una labor fundamental en la liberación controlada de fragmentos de ADN y siRNA de interferencia, como muestra Weber y colaboradores (37). En la ilustración de la Figura 5.10 se observa la transfección eficaz de oligonucleótidos antisentido por medio de dendrímeros CBS en células de la sangre.

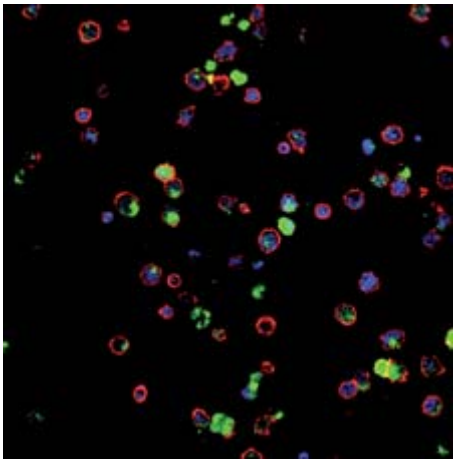


FIGURA 5.10. *Imagen de Microscopía confocal de células mononucleares de sangre periférica (PBML) transfectadas con un oligonucleótido antisentido fluorescente REV medinate un dendrímero carbosilano. Membrana celular está marcada con Texas Red en rojo, el núcleo celular está marcado con DAPI en color azul, y el oligonucleótido antisentido está marcado con FITC en color verde. Imagen cortesía laboratorio Inmunobiología Molecular (Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid).*

Dendrímeros en vectorización de fármacos

Una forma de direccionar los dendrímeros hacia las células deseadas es la de funcionalizarlos con ácido fólico, que es captado por las células por la vía del receptor de folato, el cual está sobre-expresado en las células tumorales. Los dendrímeros funcionalizados de esta forma tendrían preferencia por entrar en las células tumorales sobre las células normales, con lo cual se convierten en buena molécula base para el transporte de fármacos citotóxicos (63, 64). Muy recientemente, dendrímeros PAMAM modificados con folato en su superficie han sido utilizados como transportadores de isótopos de boro en terapias de captura de neutrones en cáncer (65). Los dendrímeros PAMAM conjugados con cisplatino actúan como un transportador macromolecular de platino, un fármaco antitumoral. Este complejo dendrímero-platino da lugar a una liberación controlada del platino, llevando a una mayor acumulación del mismo en tumores sólidos, con menor toxicidad que el cis-platino libre (66). Complejos PAMAM-plata que liberan esta última lentamente han demostrado actividad antibacteriana contra varias bacterias Gram-positivas (67).

Las aproximaciones mencionadas están basadas en uniones no covalentes entre el fármaco y el dendrímero. Una alternativa es la unión covalente mediante

un enlace biodegradable. Dendrímeros con un núcleo 1,4,7,10 tetraazaciclododecano con aminas primarias en superficie y modificados parcialmente con 1-bromoacetil-5-fluoro-uracil para formar una unión imida lábil liberan de forma controlada 5-fluoro-uracilo, un potente antitumoral, mediante hidrólisis de la imida a pH fisiológico *in vitro* (68).

Los carbohidratos son una clase de moléculas importantes en el reconocimiento biológico. Las proteínas de unión a carbohidratos son denominadas lectinas (69). Las interacciones lectina-carbohidratos han sido descritas en numerosos casos en el sistema inmune (en los eventos que llevan a activación celular), en infecciones virales y bacterianas, en relación con el cáncer y el crecimiento celular, etc. Los fármacos basados en carbohidratos tienen por tanto interés como anti-adhesinas microbianas, antagonistas de toxinas, o bien como fármacos antiinflamatorios, antivirales y anticancerosos. Un ejemplo son los glicodendrímeros, preparados mediante la unión de las aminas terminales de dendrímeros PAMAM G3 o dendrímeros de lisina a manosa-isotiocianato, ácido siálico o lactosa. Con el aducto octamérico se consigue aumentar 300-400 veces la afinidad por la lectina manosa específica del monocito-macrófago respecto a la afinidad del monosacárido (manosa) (70). Los glicodendrímeros han sido utilizados como antígenos para vacunas (71, 72). Glicodendrímeros con el antígeno T- asociado beta Gal 1-3 alfa-GalNAc disacárido se ensayaron para unión a la lectina específica de galactosa (73). Éstos pueden ser utilizados en la detección de tumores que expresen receptores de antígenos T, y para vehiculizar fármacos hacia los mismos. En conclusión, los dendrímeros glicosilados pueden mimetizar los glicoconjugados naturales e interactuar eficientemente con los receptores carbohidrato naturales.

Dendrímeros en administración transdérmica de fármacos

En el caso de algunos fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos, la administración transdérmica se está estudiando para obviar las vías más clásicas (oral, parenteral) con el fin de evitar efectos secundarios tales como los gastrointestinales o la nefrotoxicidad. La presencia del dendrímero, en unión con los fármacos a administrar, induce alteraciones en la piel que aumenta su permeabilidad (74).

Existe la posibilidad de evaluar dendrímeros, también los carbosilano, para facilitar la administración por iontoforesis de fármacos aniónicos, dotándolos de una carga total positiva que facilite su paso a través de la piel al aplicarse una diferencia de potencial entre la parte externa e interna de la misma. En este particular merece especial atención la posible administración de insulina a través de la piel.

Dendrímeros como antivirales

En general, los dendrímeros antivirales funcionan mimetizando artificialmente las superficies celulares aniónicas, por lo tanto estos dendrímeros son diseñados con grupos aniónicos de superficie como residuos sulfonato o de ácido siálico, que son carbohidratos acídicos presentes en la superficie celular. En otras palabras, el dendrímero compite con la superficie celular por la unión al virus, llevando a una menor probabilidad de infección de la célula por parte de éste (Figura 5.11). Dendrímeros de polilisina modificados con residuos de naftil y con grupos sulfonato de superficie han demostrado inhibir la infección por Herpes Simplex *in vitro* (40), inhibiendo no sólo la entrada sino también pasos posteriores de la replicación viral (75); lo mismo ocurre con PAMAM modificados covalentemente con residuos naftil-sulfonato: en este caso son capaces de inhibir la replicación del VIH tanto a nivel de la entrada celular como en pasos posteriores, interfiriendo con la retrotranscriptasa y la integrasa (76, 77).

PAMAM funcionalizados con ácido siálico inhiben eficientemente la infección por Influenza A H3N2; sin embargo, la inhibición está limitada a este subtipo de Influenza (78). Se ha diseñado también un dendrímero con grupos amida de superficie que funciona como inhibidor del virus respiratorio sincitial. El mecanismo exacto no es del todo conocido, pero parece que es debido a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos periféricos del dendrímero con la proteína de fusión del virus.

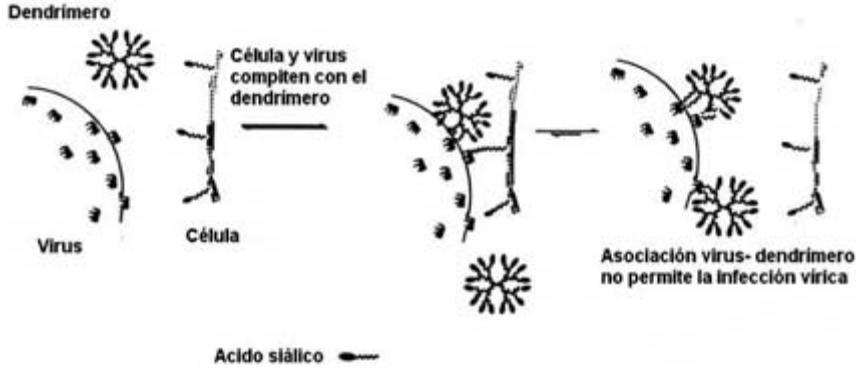


FIGURA 5.11. *Mecanismo de acción de los dendrímeros como antivirales.*

Dendrímeros como antibacterianos

En contraste con los dendrímeros antivirales, los dendrímeros antibacterianos contienen generalmente grupos catiónicos de superficie tales como aminas o grupos tetraalquil amonio. Estos dendrímeros catiónicos se adhieren y dañan la membrana bacteriana, causando la lisis de la bacteria. Dendrímeros PPI con grupos alquil amonio terciarios de superficie han demostrado una amplia actividad bactericida tanto contra Gram positivos como contra Gram negativos (79, 80). Estos dendrímeros presentan una mayor capacidad bactericida que otros polímeros hiperramificados.

Dendrímeros de polilisina han demostrado inhibir la adhesión de *E. coli* a eritrocitos equinos en ensayos de hemaglutinación (81). Los dendrímeros CBS de generación 5 y 6 demostraron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram+ y Gram- (82). Según De la Mata y colaboradores, esta actividad disminuye ligeramente cuando la generación de dendrímeros incrementa, principalmente en bacteria Gram-, debido principalmente a la diferencia en estructura de la pared celular en estos organismos.

Dendrímeros como antitumorales

En tratamientos fotodinámicos, el fármaco se convierte en tóxico tras irradiación debido a la formación *in situ* de pequeñas cantidades de oxígeno en estado singlete, el cual tiene efectos fisiológicos deletéreos (83). En comparación, el fármaco no debe ser tóxico bajo condiciones de no irradiación (pro-fármaco). Se han publicado algunos artículos acerca de dendrímeros portadores de drogas fotosensibles; por ejemplo, conteniendo ácido 5-aminolevulínico en la periferia, siendo éstos prometedores agentes para tratamiento de tumores de queratinocitos (84). Dendrímeros basados en poliarileter portando protoporfirina como fotosensibilizador han sido evaluados como candidatos para el tratamiento de tumores sólidos (85).

Dendrímeros como desnaturalizantes de proteínas

Ciertos tipos de dendrímeros actúan disminuyendo la constante dieléctrica y la viscosidad del agua y desordenando su estructura regular mediante la reorganización de las moléculas de agua en la superficie del dendrímero. Esto lleva a desfavorecer las interacciones hidrofóbicas, lo cual es muy desestabilizador para

la mayoría de las estructuras terciarias de las proteínas (desnaturalización). Las sustancias que producen este efecto se llaman «caotropos», y ejemplos clásicos de los mismos son sales como el $MgCl_2$, la urea, el cloruro de guanidio, el tiocianato sódico, el tiocianato de guanidio o disolventes orgánicos como el acetonitrilo, propanol y metanol. Generalmente los caotropos sirven para desnaturalizar y solubilizar proteínas. Así, hay un ejemplo sumamente interesante de la aplicación de dendrímeros como desnaturalizantes de proteínas es su uso para disolver agregados de proteinas priónicas (86). Las proteínas priónicas son capaces de adoptar una estructura-conformación patogénica que causa neuropatías mortales llamadas encefalopatías espongiformes (Creutzfeldt-Jakob, mal de las «vacas locas», *scrapie* ovino, etc). Estas proteínas forman agregados insolubles, los cuales se encuentran en los cerebros de los individuos afectados. Estos agregados son solubles sólo en solventes que contienen tanto detergentes como desnaturalizantes (típicamente cloruro de guanidio 6 M). Sin embargo, estos agregados pueden ser solubilizados por dendrímeros catiónicos como los PEI, PPI, y los PAMAM; los de mayor generación con mayor número de aminas en superficie son los más eficaces. Lo destacable es que no se han descrito otros compuestos capaces de disolver agregados priónicos ya formados previamente.

Dendrímeros en vacunas

Es bien sabido que las moléculas de bajo peso molecular (como los péptidos) no son muy inmunogénicos o bien inducen una respuesta inmune débil tras su inyección en el huésped. Sin embargo, este problema puede ser solucionado incrementando su peso molecular bien mediante polimerización o bien mediante acoplamiento a un transportador de alto peso molecular multivalente (tradicionalmente una proteína) (87). Para la preparación de inmunógenos muy definidos y altamente reproducibles como los que se necesitan para la fabricación de vacunas, otros tipos de transportadores son muy deseables, como los dendrímeros, con una estructura muy definida y con muchos grupos funcionales capaces de unir antígenos en su periferia. Tam y col desarrollaron un dendrímero MAP (del inglés «multiple antigenic peptide») (88, 89), el cual puede ser sintetizado con mezclas definidas de epítopos B o T. La mayoría de las inmunizaciones *in vitro* ensayadas con dendrímeros MAP han sido realizadas con adyuvantes tradicionales: en el ensayo de Moreno y col. (90), se ensayó la capacidad de inducción de la producción de anticuerpos por parte de hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund y saponina en combinación con una estructura MAP que contenía péptidos de Plamodium falciparum estimuladores de células T y B. Ota y col. demostraron que las estructuras MAP eran procesadas por las células presentadoras de antígenos en la misma forma que los antígenos derivados de

patógenos intracelulares (ejemplo: virus), dando lugar a una potente respuesta inmune, incluyendo la producción de células T citotóxicas (91). Los dendrímeros MAP son construcciones asimétricas en forma de cuña formadas por sucesivas generaciones de residuos de lisina. Estos dendrímeros presentan un gran número de aminas primarias que pueden ser acopladas a antígenos de bajo peso molecular, con la intención de aumentar la inmunogenicidad, obviando la necesidad de utilizar proteínas transportadoras. Este tipo de estructuras MAP están en ensayo para obtener vacunas para la malaria y la enfermedad «pié-boca» (92-94).

Las estructuras MAP han sido utilizadas también para transportar antígenos no peptídicos como carbohidratos, haptenos, etc, en el contexto de vacunas: un ejemplo es su estudio en vacunaciones contra tumores de colon en rata con aluminio como adyuvante (95).

Por otra parte, los dendrímeros pueden ser utilizados ellos mismos como adyuvantes en vacunaciones (un adyuvante es una sustancia que aumentan la inmunogenicidad de un antígeno deseado cuando los dos se administran en conjunto) (41).

Dendrímeros actualmente en fase preclínica o clínica

Debido al gran interés que han despertado los dendrímeros en los últimos 20 años, algunos de ellos se encuentran en fases preclínicas, y uno sólo de ellos en fase clínica.

En la actualidad los dendrímeros son moléculas con un alto grado de especialización, y como hemos analizado en el apartado anterior, pueden ser aplicados a diversas ramas de la medicina: tratamiento, prevención y diagnóstico.

En la Tabla 5.2 se enumeran algunas patentes mundiales de fármacos por distintas instituciones, empresas farmacéuticas y empresas de biotecnología.

Como diagnóstico se ha encontrado una aplicación interesante de un dendrímero de gadolinio utilizado para diagnosticar fallo renal agudo inducido por sepsis mediante imágenes de resonancia magnética (96).

En el campo de la prevención, podemos encontrar dendrímeros utilizados como antivirales para la prevención de la infección por VIH (97). El dendrímero SPL7013 (Vivagel®, Starpharma Pty, Ltd.) está siendo desarrollado como fórmula de aplicación tópica vaginal para impedir la infección del virus durante el acto sexual. Este dendrímero es actualmente el primero y el único tratamiento basado en dendrímeros que está autorizado para proceder con los ensayos clínicos por la FDA y la fase I de ensayos en humanos ya ha sido testada con éxito (97).

TABLA 5.2. *Muestra de patentes de dendrímeros y aplicaciones terapéuticas y diagnósticas de los mismos.*

Patente	Licenciatario	Título	Aplicación
WO 2008133954	Genzyme Corporation	Dendrímeros amido-amina	
WO 2008121153	University of Utah	Métodos de producción y usos de los dendrímeros	Excipientes farmacéuticos
WO 2008089256	Cappella, Inc	Terapéutica con dendrímeros	Lesiones inflamatorias en cáncer
JP2008050283	Saitama University	Acidos siálicos tipo tiolglicósido unidos a dendrímeros	Influenza
WO 2008017122	Starpharma Pty.Ltd. Baker Medical Research Institute	Agentes de contraste de dendrímeros polilisina	
WO 2008017125	Starpharma Pty.Ltd.	Agente terapéutico de dendrímero de polilisina	
WO 2008011967 **DE 102006035041**	Patente Merck GmbH	1,4-Bis(2-tienilvinil)benzol derivados y su uso	
WO 2008011047	Genzyme Corp.	Dendrímeros aminados	Hiperfosfatemia
WO 2008008483	University of Michigan	Métodos de producción y usos de los dendrímeros	Diagnóstico de cáncer
WO 2007149500	Dendritic Nanotechnologies, Inc.	Formulaciones conteniendo dendrímeros híbridos	

Como tratamiento avanzado en preclínica los dendrímeros (G5) están siendo estudiados en el grupo de James Baker y colaboradores (98) como transportador de un fármaco citostático, el metotrexato (MTX), y funcionalizados con ácido fólico (FA) en su superficie. El conjugado resultante, G5-FA-MTX ha demostrado su eficacia y especificidad en células con receptor de ácido fólico *in vitro* e *in vivo*. Los estudios en fases clínicas deberán demostrar que este conjugado tiene una viabilidad para el tratamiento del cáncer.

En la Tabla 5.3 se muestran algunos dendrímeros en su fase preclínica o clínica más avanzada, donde podemos observar la gran diversidad de aplicaciones que pueden tener los dendrímeros que actualmente están siendo objeto de intensas investigaciones en todo el mundo.

TABLA 5.3. *Fases clínicas y preclínicas de los dendrímeros en los que se busca una aplicación terapéutica, diagnóstica o preventiva.*

Fase	Código	Producto	Aplicación	Mecanismo de acción	Organización
Clínica I	SPL 7013	Dendrimero	Prevención HIV y herpes genital	Antiviral tópico vaginal	Starpharma Pty, Ltd.
Preclínica	DAB-Am64-(1B4M-Gd)64	Complejo dendrímero-gadolinio	Diagnóstico por RMN de cáncer hepatobiliar		Universidad Kyoto y National Cancer Institute
Preclínica		Dendrímeros	Fármacos oncolíticos		College Universitaire de Saint-Boniface y Ohio State University
Preclínica		Dendrímeros	Fármacos oncolíticos		College Universitaire de Saint-Boniface y Ohio State University
Preclínica	pGEG.FasL		Terapia génica	Terapia cáncer de próstata	Kyoto Prefectural University of Medicine
Diagnóstico biológico	C3d	Dendrímeros	Diabetes tipo I	Agentes neurotróficos	
Preclínica	FGL-4 FGL-D	Dendrímeros	Tratamiento ictus y desórdenes Cognitivos	Activadores FGFR1	Enkam
Preclínica	BD-C225 C225-G5-B1100	Dendrímeros radiosensibili-zantes	Fármacos oncolíticos		Ohio State University
Preclínica	Gd-D1	Complejos Dendrímero-Gadolinio	Agentes para RMN		Mitsubishi Tanabe Pharma
Diagnóstico biológico		Dendrímeros	Tratamiento trastornos renales e hiperparatoidismo		Genzyme

CONCLUSIONES

En conclusión, los dendrímeros son polímeros sintéticos con una forma globular extremadamente bien definida y con una serie de propiedades inmejorables para su uso en aplicaciones biológicas. Responden de forma predecible en solución, pueden ser modificados ampliamente para portar múltiples ligandos

con actividad biológica, pueden atravesar barreras biológicas, y son fabricados con muy pocos defectos estructurales, lo cual hace fácil su análisis por medios tales como espectrometría de masas, espectroscopía de infrarrojos o resonancia magnética nuclear (RMN).

Existen distintos tipos de dendrímeros diferentes en su química que están siendo estudiados para transfección de genes u oligonucleótidos, transportadores de fármacos, diseño de vacunas, interacciones huésped-receptor, biosensores, etc. Es importante resaltar que los dendrímeros tienen una enorme aplicación también en otros campos tales como la cosmética, electrónica, fotónica, industrias químicas, entre otros. Desde tecnología basada en dendrímeros para formar pelotas de golf (US patent 7101951), hasta productos nanoscópicos para el pelo que incluyen dendrímeros (US Patent 0072728). En este sentido, la compañía ExxonMobil es propietaria de una patente basada en tecnología de dendrímeros donde se utilizan para incrementar el flujo del aceite a temperaturas muy frías. También el US Army Research Laboratory está desarrollando un agente de detección de anthrax basado en dendrímeros, llamado «*Alert Ticket*».

La irrupción en el campo de la Biomedicina de estas macromoléculas dará lugar a la aparición de nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico empleando fármacos y moléculas ya conocidos o de nueva aparición, que se combinarán con los dendrímeros para adquirir nuevas compuestos farmacéuticos con alto grado de especialización, seguridad y eficacia ofreciendo un alto valor terapéutico y de bienestar a la sociedad.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Dykes, G.M., Brierley, L.J., Smith, D.K., McGrail, P.T. & Seeley, G.J. (2001) Supramolecular solubilisation of hydrophilic dyes by using individual dendritic branches. *Chemistry*. 7: 4730-9.

(2) Boas, U. & Heegaard, P.M. (2004) Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev*. 33: 43-63.

(3) Buhleier, W.W. & Vögtle, F. (1978) Cascade and Nonskid-chain-like Synthesis of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis*. 2: 155-158.

(4) R. G. Denkewalter, J.F.K.a.W.J.L. (1983) Patent US4410688, 1983.ed.^eds)

(5) Tomalia, D.A., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J. & Smith, P. (1985) A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J*. 17: 117-132.

(6) de Brabrander van den Berg, E.M.M. & Meijer, E.W. (1993) Poly(propylene imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Hetereogeneously Catalyzed Hydrogenations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 32: 1308-1311.

(7) C. J. Hawker, K.L.W.a.J.M.J.F. (1993) Unimolecular micelles and globular amphiphiles dendritic macromolecules as novel recyclable solubilization agents. *J. Chem. Soc., Perkin Trans* 1: 1287-1297.

(8) Turnbull, W.B. & Stoddart, J.F. (2002) Design and synthesis of glycodendrimers. *J. Biotechnol*. 90: 231-55.

(9) Majoral, J.P. & Caminade, A.M. (1999) Dendrimers containing heteroatoms (si, p, B, ge, or bi). *Chem. Rev.* 99: 845-80.

(10) Kim, R.R.a.J.M. (1999) Amphiphilic p-tert-Butylcalix[4]arene Scaffolds Containing Exposed Carbohydrate Dendrons. *Angew. Chem. Int. Ed*. 38: 369-372.

(11) Ortega, P. et al. (2006) Novel water-soluble carbosilane dendrimers: Synthesis and biocompatibility. *Eur. J. Inorg. Chem*. 7: 1388-1396.

(12) A. W. Bosman, H.M.J.a.E.W.M. (1999) About dendrimers: Structure, physical properties, and applications. *Chem. Rev*. 99: 1665-1688.

(13) Frechet, C.J.H.a.J.M.J. (1990) A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J. Am. Chem. Soc*. 112: 7638-7647.

(14) Avnir, D.F.a.D. (1991) Surface Fractality of Dendrimers. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl*. 30: 1379-1380.

(15) Jackson, C.L., Chanzy, H.D., Booy, F.P., Drake, B.J., Tomalia, D.A., Bauer, B.J. & Amis, E.J. (1998) Visualization of Dendrimer Molecules by Transmission Electron Microscopy (TEM): Staining Methods and Cryo-TEM of Vitrified Solutionsed.^eds), pp. 6259-6265.

(16) Lee, B.D.A., Wetzel, A.W., Meixner, W. & Baker, J.R. (2002) Structural Molecular Dynamic Studies on Therapeutically-Applied Polyamidoamine Dendrimers: The Effects of pH and Surface Derivatization Group. *Macromolecules*. 35

(17) W. Chen, D.A.T.a.J.L.T. (2000) *Macromolecules*. 33: 9169.9172.

(18) Autumn, K., Liang, Y.A., Hsieh, S.T., Zesch, W., Chan, W.P., Kenny, T.W., Fearing, R. & Full, R.J. (2000) Adhesive force of a single gecko foot-hair. *Nature*. 405: 681-5.

(19) Lundquist, J.J., Debenham, S.D. & Toone, E.J. (2000) Multivalency effects in protein—carbohydrate interaction: the binding of the Shiga-like toxin 1 binding subunit to multivalent C-linked glycopeptides. *J. Org. Chem*. 65: 8245-50.

(20) Ehrlich, P.H. (1979) The effect of multivalency on the specificity of protein and cell interactions. *J. Theor. Biol*. 123-127.

(21) M. Mammen, S.-K.C.a.G.M.W. (1998) Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 2754-2794.

(22) J. B. Corbell, J.J.L.a.E.J.T. (2000) A comparison of biological and calorimetric analyses of multivalent glycodendrimer ligands for concanavalin A. 11: 95-111.

(23) Rittner, A.B., Bompard, S., Heitz, F., Divita, G., Brasseur, R. & Jacobs, E. (2002) New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol. Therapy*. 5: 104-114.

(24) Jevprasesphant, R., J.P., Jalal, R., Attwood, D., McKeown, N.B. & D'Emanuele, A. (2003) The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* 252: 263-266.

(25) El Sayed, M., M.G., Rhodes, C. & Ghandehari, H. (2002) Transepithelial Transport of Polyamidoamine Dendrimers Across Caco-2 Cell Monolayers. *J. Controlled Release*. 81: 355-365.

(26) Roberts, J.C., Bhalgat, M.K. & Zera, R.T. (1996) Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res.* 30: 53-65.

(27) Malik, N. et al. (2000) Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release*. 65: 133-48.

(28) Brazeau, G.A., Attia, S., Poxon, S. & Hughes, J.A. (1998) In vitro myotoxicity of selected cationic macromolecules used in non-viral gene delivery. *Pharm. Res.* 15: 680-4.

(29) Supattapone, S., H.-O.B.N., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. & Scott, M. (1999) Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 14529-14534.

(30) Fischer, D., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. & Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. 24: 1121-1131.

(31) Zinselmeyer, B.H., Mackay, S.P., Schatzlein, A.G. & Uchegbu, I.F. (2002) The lower-generation polypropylenimine dendrimers are effective gene-transfer agents. *Pharm. Res.* 19: 960-7.

(32) Chonco, L., Rasines, B., Gomez, R., De la Mata, F.J. & Munoz-Fernandez, M.A. (2008) Prevention of HIV-mucosal barrier interaction by new synthesized carbosilane polyanionic dendrimers. In Trends in Nanotechnology ed.^eds), Oviedo (Spain).

(33) Yoo, H. & Juliano, R.L. (2000) Enhanced delivery of antisense oligonucleotides with fluorophore-conjugated PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res.* 28: 4225-31.

(34) Bielinska, A., Kukowska-Latallo, J.F., Johnson, J., Tomalia, D.A. & Baker, J.R., Jr. (1996) Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res*. 24: 2176-82.

(35) Shah, D.S., Sakthivel, T., Toth, I., Florence, A.T. & Wilderspin, A.F. (2000) DNA transfection and transfected cell viability using amphipathic asymmetric dendrimers. *Int. J. Pharm*. 208: 41-8.

(36) Chonco, L. et al. (2007) Water-soluble carbosilane dendrimers protect phosphorothioate oligonucleotides from binding to serum proteins. *Org. Biomol. Chem*. 5: 1886-93.

(37) Weber, N., Ortega, P., Clemente, M.I., Shcharbin, D., Bryszewska, M., de la Mata, F.J., Gomez, R. &Munoz-Fernandez, M.A. (2008) Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes. *J. Control. Release*. 132: 55-64.

(38) Gebhart, C.L. & Kabanov, A.V. (2001) Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J. Control. Release*. 73: 401-16.

(39) Andrews, J.M., Newbound, G.C. & Lairmore, M.D. (1997) Transcriptional modulation of viral reporter gene constructs following induction of the cellular stress response. *Nucleic Acids Res*. 25: 1082-4.

(40) Bourne, N., Stanberry, L.R., Kern, E.R., Holan, G., Matthews, B. & Bernstein, D.I. (2000) Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother*. 44: 2471-4.

(41) Rajananthanan, P., Attard, G.S., Sheikh, N.A. & Morrow, W.J. (1999) Evaluation of novel aggregate structures as adjuvants: composition, toxicity studies and humoral responses. *Vaccine*. 17: 715-30.

(42) Padilla De Jesus, O.L., H.R.I., Gagne, L., Frechet. J.M., & Szoka, F.C. Jr. (2002) Polyester Dendritic Systems for Drug Delivery Applications: Design, Synthesis, and Characterization. *Bioconjugate Chem*. 13: 453-461.

(43) Ihre, H.R., D.P., Szoka, F.C., & Frechet, J.M. (2002) Polyester Dendritic Systems for Drug Delivery Applications: Design, Synthesis, and Characterization. *Bioconjugate Chem*. 13: 443-452.

(44) Kobayashi, H. et al. (2001) Positive effects of polyethylene glycol conjugation to generation-4 polyamidoamine dendrimers as macromolecular MR contrast agents. *Magn. Reson. Med*. 46: 781-8.

(45) Wimmer, N., Marano, R.J., Kearns, P.S., Rakoczy, E.P. & Toth, I. (2002) Syntheses of polycationic dendrimers on lipophilic peptide core for complexation and transport of oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 12: 2635-7.

(46) Roessler, B.J., Bielinska, A.U., Janczak, K., Lee, I. & Baker, J.R., Jr. (2001) Substituted beta-cyclodextrins interact with PAMAM dendrimer-DNA complexes and modify transfection efficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 124-9.

(47) Mannistö, M., Toncheva, V., Elomaa, M., Ruponen, M., Schacht, E. & Urtti, A. (2002) Structure-activity relationships of poly(l-lysines): effects of pegylation and molecular shape on physicochemical and biological properties in gene delivery. *J. Controlled Release.* 83: 169-182.

(48) Tang, M.X., Redemann, C.T. & Szoka, F.C., Jr. (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 7: 703-14.

(49) El-Sayed, M., Kiani, M.F., Naimark, M.D., Hikal, A.H. & Ghandehari, H. (2001) Extravasation of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers across microvascular network endothelium. *Pharm. Res.* 18: 23-8.

(50) Wiwattanapatapee, R., Carreno-Gomez, B., Malik, N. & Duncan, R. (2000) Anionic PAMAM dendrimers rapidly cross adult rat intestine in vitro: a potential oral delivery system? *Pharm. Res.* 17: 991-8.

(51) J. F. G. A. Jansen, E.W.M.a.E.M.M.d.B.v.d.B. (1996) The dendritic box and bengal rose. *Macromol. Symp.* 102: 27-33.

(52) Evangelista-Lara, A. & Guadarrama, P. (2005) Theoretical evaluation of the nanocarrier properties of two families of functionalized dendrimersed.^eds), pp. 460-470

(53) Twyman, L.J., A.E.B., Esfand, R., Hardy, M.J. & Mitchell, J.C. (1999) The synthesis of water soluble dendrimers and their application as possible drug delivery systems. *Tetrahedron Lett.* 40: 1743-1746.

(54) Shcharbin, D. et al. (2007) Analysis of interaction between dendriplexes and bovine serum albumin. *Biomacromolecules.* 8: 2059-62.

(55) Bermejo, J.F. et al. (2007) Water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications. *Chemistry.* 13: 483-95.

(56) Hughes, J.A., Aronsohn, A.I., Avrutskaya, A.V. & Juliano, R.L. (1996) Evaluation of adjuvants that enhance the effectiveness of antisense oligodeoxynucleotides. *Pharm. Res.* 13, 404-10.

(57) Yoo, H., Sazani, P. & Juliano, R.L. (1999) PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense oligonucleotides. *Pharm. Res.* 16: 1799-804.

(58) Lebedeva, I., Benimetskaya, L., Stein, C.A. & Vilenchik, M. (2000) Cellular delivery of antisense oligonucleotides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50: 101-19.

(59) Jaaskelainen, I., Peltola, S., Honkakoski, P., Monkkonen, J. & Urtti, A. (2000) A lipid carrier with a membrane active component and a small complex size are re-

quired for efficient cellular delivery of anti-sense phosphorothioate oligonucleotides. *Eur. J. Pharm. Sci.* 10: 187-93.

(60) Gossl, I., Shu, L., Schluter, A.D. & Rabe, J.P. (2002) Molecular structure of single DNA complexes with positively charged dendronized polymers. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 6860-5.

(61) Tang, M.X. & Szoka, F.C. (1997) The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* 4: 823-32.

(62) Dennig, J. & Duncan, E. (2002) Gene transfer into eukaryotic cells using activated polyamidoamine dendrimers. *J. Biotechnol.* 90: 339-47.

(63) Kono, K., Liu, M. & Frechet, J.M. (1999) Design of dendritic macromolecules containing folate or methotrexate residues. *Bioconjug. Chem.* 10: 1115-21.

(64) Quintana, A. et al. (2002) Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharm. Res.* 19: 1310-6.

(65) Shukla, G.W., Chatterjee, M., Yang, W., Sekido, M., Diop, L.A., Muller, R., Sudimack, J. J., Lee, R. J., Barth, R.F. & W. Tjarks, W. (2003) Synthesis and biological evaluation of folate receptor-targeted boronated PAMAM dendrimers as potential agents for neutron capture therapy. *Bioconjugate Chem.* 14: 158-167.

(66) Malik, N., Evagorou, E.G. & Duncan, R. (1999) Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs.* 10: 767-76.

(67) Balogh, L., Tomalia, D.A., Hagnauer, G.L. & McManus, A.T. (2001) Dendrimer-Silver Complexes and Nanocomposites as Antimicrobial Agents. *Nano Lett.* 1, 18-21.

(68) R. X. Zhuo, B.D.a.Z.R.L. (1999) In vitro release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer. *J. Controlled Release.* 57: 249-257.

(69) Boyd, W.C. & Shapleigh, E. (1954) Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. *J. Immunol.* 73: 226-31.

(70) Roy, R. (1996) Syntheses and some applications of chemically defined multivalent glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 692-702.

(71) Veprek, P. & Jezek, J. (1999) Peptide and glycopeptide dendrimers. Part II. *J. Pept. Sci.* 5: 203-20.

(72) Andre, S., Pieters, R.J., Vrasidas, I., Kaltner, H., Kuwabara, I., Liu, F.T., Liskamp, R.M. & Gabius, H.J. (2001) Wedgelike glycodendrimers as inhibitors of binding of mammalian galectins to glycoproteins, lactose maxiclusters, and cell surface glycoconjugates. *Chembiochem.* 2: 822-30.

(73) R. Roy, M.G.B.a.O.R. (2001) Synthesis of N,N '-bis(acrylamido)acetic acid-based T-antigen glycodendrimers and their mouse monoclonal IgG antibody binding properties. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 1809-1816.

(74) Chauhan, A.S., Chalasani, K.B., Jain, A. K., Jain, S.K., Jain, N.K., & Diwan, P.V. (2003) D endrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *J. Control. Rel.* 90: 335-343.

(75) Gong, Y. et al. (2002) Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res.* 55: 319-29.

(76) Witvrouw, M. et al. (2000) Polyanionic (i.e., polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle. *Mol. Pharmacol.* 58: 1100-8.

(77) Witvrouw, M., Weigold, H., Pannecouque, C., Schols, D., De Clercq, E. & Holan, G. (2000) Potent anti-HIV (type 1 and type 2) activity of polyoxometalates: structure-activity relationship and mechanism of action. *J. Med. Chem.* 43: 778-83.

(78) Landers, J.J. et al. (2002) Prevention of influenza pneumonitis by sialic Acid-conjugated dendritic polymers. *J. Infect. Dis.* 186: 1222-30.

(79) Cooper, C.Z.C.a.S.L. (2002) Interactions Between Dendrimer Biocides and Bacterial Membranes. *Biomaterials.* 23: 3359-3368.

(80) Chen, C.Z., Beck-Tan, N.C., Dhurjati, P., van Dyk, T.K., LaRossa, R.A. & Cooper, S.L. (2000) Quaternary ammonium functionalized poly(propylene imine) dendrimers as effective antimicrobials: structure-activity studies. *Biomacromolecules.* 1: 473-80.

(81) Nagahori, N., Lee, R.T., Nishimura, S., Page, D., Roy, R. & Lee, Y.C. (2002) Inhibition of adhesion of type 1 fimbriated Escherichia coli to highly mannosylated ligands. *Chembiochem.* 3: 836-44.

(82) Ortega, P., Copa-Patino, J.L., Munoz-Fernandez, M.A., Soliveri, J., Gomez, R. & de la Mata, F.J. (2008) Amine and ammonium functionalization of chloromethylsilane-ended dendrimers. Antimicrobial activity studies. *Org. Biomol. Chem.* 6: 3264-9.

(83) Devasagayam, T.P. & Kamat, J.P. (2002) Biological significance of singlet oxygen. *Indian J. Exp. Biol.* 40: 680-92.

(84) Battah, S.H., Chee, C.E., Nakanishi, H., Gerscher, S., MacRobert, A.J. & Edwards, C. (2001) Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for photodynamic therapy. *Bioconjug. Chem.* 12: 980-8.

(85) Nishiyama, N., Stapert, H.R., Zhang, G.D., Takasu, D., Jiang, D.L., Nagano, T., Aida, T. & Kataoka, K. (2003) Light-harvesting ionic dendrimer porphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioconjug. Chem.* 14: 58-66.

(86) Supattapone, S.B.P.a.S. (2002) ed.^eds), pp. 31. 0041859, USA.

(87) Van Regenmortel, M.H., Muller, S. & Plaue, S. (1988) Synthetic Polypeptides as Antigens. Amsterdam.

(88) Sadler, K. & Tam, J.P. (2002) Peptide dendrimers: applications and synthesis. *J. Biotechnol.* 90: 195-229.

(89) Spetzler, J.C. & Tam, J.P. (1996) Self-assembly of cyclic peptides on a dendrimer: multiple cyclic antigen peptides. *Pept. Res.* 9: 290-6.

(90) Moreno, C.A., Rodriguez, R., Oliveira, G.A., Ferreira, V., Nussenzweig, R.S., Moya Castro, Z.R., Calvo-Calle, J.M. & Nardin, E. (1999) Preclinical evaluation of a synthetic Plasmodium falciparum MAP malaria vaccine in Aotus monkeys and mice. *Vaccine.* 18: 89-99.

(91) Ota, S., Ono, T., Morita, A., Uenaka, A., Harada, M. & Nakayama, E. (2002) Cellular processing of a multibranched lysine core with tumor antigen peptides and presentation of peptide epitopes recognized by cytotoxic T lymphocytes on antigen-presenting cells. *Cancer Res.* 62: 1471-6.

(92) De Oliveira, E., Villen, J., Giralt, E. & Andreu, D. (2003) Synthetic approaches to multivalent lipopeptide dendrimers containing cyclic disulfide epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Bioconjug. Chem.* 14: 144-52.

(93) Nardin, E.H. et al. (2001) A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing Plasmodium falciparum B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. *J. Immunol.* 166: 481-9.

(94) Nardin, E.H. et al. (2000) Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. *J. Infect. Dis.* 182: 1486-96.

(95) Bay, S., Lo-Man, R., Osinaga, E., Nakada, H., Leclerc, C. & Cantacuzene, D. (1997) Preparation of a multiple antigen glycopeptide (MAG) carrying the Tn antigen. A possible approach to a synthetic carbohydrate vaccine. *J. Pept. Res.* 49: 620-5.

(96) Dear, J.W., Kobayashi, H., Jo, S.K., Holly, M.K., Hu, X., Yuen, P.S., Brechbiel, M.W. & Star, R.A. (2005) Dendrimer-enhanced MRI as a diagnostic and prognostic biomarker of sepsis-induced acute renal failure in aged mice. *Kidney Int.* 67: 2159-67.

(97) Rupp, R., Rosenthal, S.L. & Stanberry, L.R. (2007) VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer—microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *Int. J. Nanomedicine.* 2: 561-6.

(98) Myc, A., Douce, T.B., Ahuja, N., Kotlyar, A., Kukowska-Latallo, J., Thomas, T.P. & Baker, J.R., Jr. (2008) Preclinical antitumor efficacy evaluation of dendrimer-based methotrexate conjugates. *Anticancer Drugs*. 19: 143-9.

6. Nanocristales

RAMÓN MARTÍNEZ PACHECO

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se cifra en más del 40% la proporción de nuevos fármacos que se caracterizan por presentar una reducida hidrosolubilidad (1). Generalmente, se trata de fármacos clase II en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (2) para los que la disolución constituye la etapa limitante de su absorción.

La formulación de este tipo de fármacos plantea numerosos e importantes problemas derivados del hecho de que su biodisponibilidad oral es incompleta, variable y dependiente de factores como la ingestión concomitante de alimentos (3). Tampoco el desarrollo de formas parenterales está exenta de problemas, a consecuencia del volumen de vehículo necesario para incorporar sus dosis terapéuticas (4, 5).

Para obviar estos problemas se han propuesto diversas aproximaciones tecnológicas entre las que cabe destacar la obtención de sales del fármaco, la utilización de disolventes no acuosos o de cosolventes, la adición de agentes solubilizantes, la formación de complejos de inclusión o la incorporación del fármaco a emulsiones, microemulsiones, liposomas o dispersiones sólidas (6-16).

Aunque, para algunos fármacos, estas aproximaciones han resultado eficaces, cuentan con importantes limitaciones referidas a la necesidad de que el fármaco reúna ciertas características como contener en su molécula grupos ionizables, ser soluble en determinados disolventes o mezclas de disolventes, contar con un tamaño y una forma molecular adecuadas o administrarse a dosis redu-

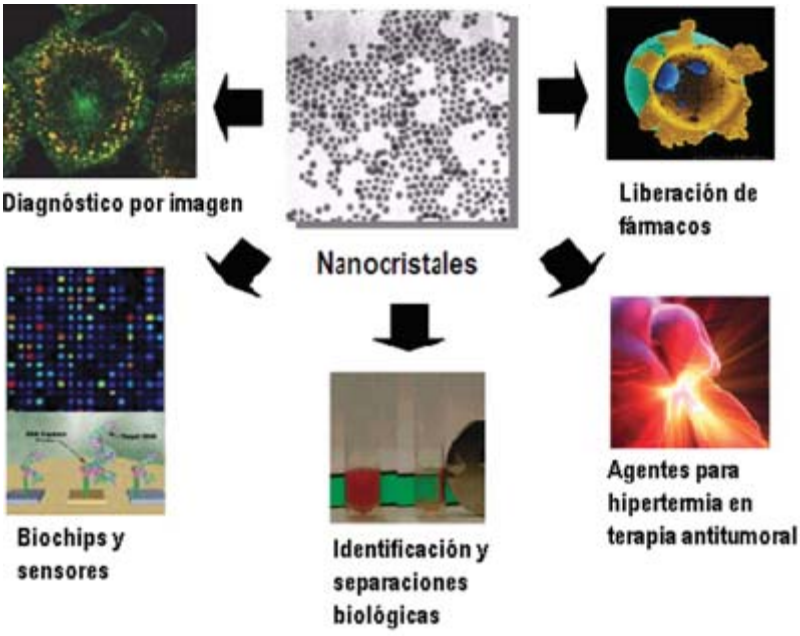


FIGURA 6.1. *Aplicaciones biomédicas de los nanocristales.*

cidas. Además, en la incorporación a las formas de dosificación de disolventes no acuosos o de determinados aditivos, puede situarse el origen de la aparición de algunos efectos indeseables o de toxicidad (17).

En principio, una reducción del tamaño de partícula del fármaco, a través de cualquiera de los procedimientos disponibles, carece de la mayor parte de las limitaciones señaladas. Así, la micronización ha permitido incrementar la biodisponibilidad oral de un buen número de fármacos poco hidrosolubles, al reducir su tamaño medio de partícula hasta valores comprendidos entre 1 y 20 micras (18, 19). Sin embargo, para aquellos fármacos de hidrosolubilidad especialmente reducida, el incremento que produce la micronización sobre su velocidad de disolución, derivado del aumento de su superficie específica, no es suficiente para que su biodisponibilidad resulte completa.

En esta situación, se hace necesario desarrollar nuevas aproximaciones tecnológicas, en especial aquéllas que sean aplicables a cualquier fármaco, que permitan obviar los numerosos problemas descritos en párrafos anteriores.

Con esta finalidad, en la década de los noventa, se introdujeron los primeros procedimientos útiles para intensificar los efectos comentados de la reduc-

ción del tamaño de partícula; es decir, procedimientos que permiten la obtención de partículas cristalinas submicrométricas, conocidas como nanocristales, de tamaño comprendido entre 1 y 1000 nanometros (y, más frecuentemente, entre 100 y 400 nm), habitualmente en forma de nanosuspensión.

Las importantes reducciones en el tamaño de partícula que provocan estos procesos de nanonización, se acompañan de incrementos muy acusados sobre su velocidad de disolución, que no sólo se explican por los espectaculares aumentos de la superficie específica que experimentan los fármacos, sino a través de otros mecanismos que se analizarán seguidamente; no obstante, conviene señalar que, al margen de su efecto sobre la disolución de fármacos, los nanocristales han encontrado otras importantes aplicaciones biomédicas, tal como se recoge en la Figura 6.1.

MECANISMOS DE ACELERACIÓN DEL PROCESO DE DISOLUCIÓN EN NANOCRISTALES

Para llevar a cabo el análisis de estos mecanismos, resulta útil acudir a la ecuación de Nerst y Brunner (20), expresión de la teoría de la capa de difusión, que adopta la forma:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D \cdot S}{h \cdot V} (Cs - C)$$

en la que dC/dt representa la velocidad de disolución del sólido, D el coeficiente de difusión del fármaco en el medio de disolución de volumen V, S la superficie del sólido, C_s el coeficiente de solubilidad del sólido y C la concentración de sólido disuelto a tiempo t.

Así, la ecuación de Nerst-Brunner predice incrementos proporcionales en la velocidad de disolución como consecuencia de la ampliación, de hasta 50 veces, de la superficie del sólido, (S) que supone la reducción del tamaño de sus partículas hasta valores nanométricos. También permite predecir incrementos adicionales en la velocidad de disolución del sólido derivados de una reducción del espesor de la capa de difusión (h) que lleva aparejada la reducción de su tamaño de partícula y que pueden cuantificarse a través de la ecuación de Prandtl (21).

Además, toda reducción del tamaño de partícula de un sólido por debajo de 1-2 micras, da lugar a incrementos apreciables de su coeficiente de solubilidad (C_s). La ecuación de Freundlich-Ostwald (22) establece la existencia de una relación de

tipo exponencial entre ambas variables, que puede suponer un aumento en el valor del coeficiente de solubilidad del sólido en el medio de disolución de hasta un 50%.

PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE NANOCRISTALES

Dentro del ámbito, más amplio, de los procedimientos de ingeniería de partículas hoy disponibles, que se han esquematizado en la Figura 6.2, son tres los métodos a los que es posible acudir para la producción de nanocristales. Uno de ellos, la precipitación controlada, es un método de agregación (*bottom up* en terminología anglosajona) que parte de una dispersión molecular del sólido y se basa en el equilibrio entre fases. Los otros dos, pulverización húmeda en molinos de perlas y homogeneización a alta presión, son métodos de fragmentación (es decir, *top down*) basados en la división mecánica de las partículas del sólido. Antes de pasar a describir las principales características, ventajas y limitaciones de cada uno de los procedimientos indicados, conviene llamar la atención acerca de la rápida evolución que está experimentando este campo en los últimos años, por lo que, de forma permanente, se están desarrollando nuevas e interesantes aproximaciones, en especial aquéllas que implican el uso de fluidos supercríticos.

Precipitación controlada

Aunque se trata de un procedimiento basado en un principio clásico, a partir de la década de los noventa, se desarrollaron y patentaron una serie de variantes que posibilitan la obtención de precipitados formados por partículas submicrométricas que, en ciertos casos, suponen la incorporación a los sistemas de agentes estabilizantes o la utilización de fluidos supercriticos y que han dado lugar a productos/técnicas protegidas como Hydrosol® de la actual Novartis (23) y Nanomorph® de Soliqs-Abbott (24, 25).

En términos generales, el procedimiento consiste en adicionar una disolución del fármaco en un disolvente orgánico sobre una fase acuosa miscible con la orgánica. Esta adición provoca una repentina sobresaturación, a la que sigue el proceso de nucleación.

Las principales variable sobre las que se puede actuar para modular las características de los precipitados son la temperatura, la intensidad de agitación y la concentración de fármaco disuelto en la fase orgánica. Así, una reducción de la temperatura normalmente da lugar a un menor coeficiente de solubilidad del sólido y facilita que se alcancen la supersaturación y la nucleación, posibilitan-

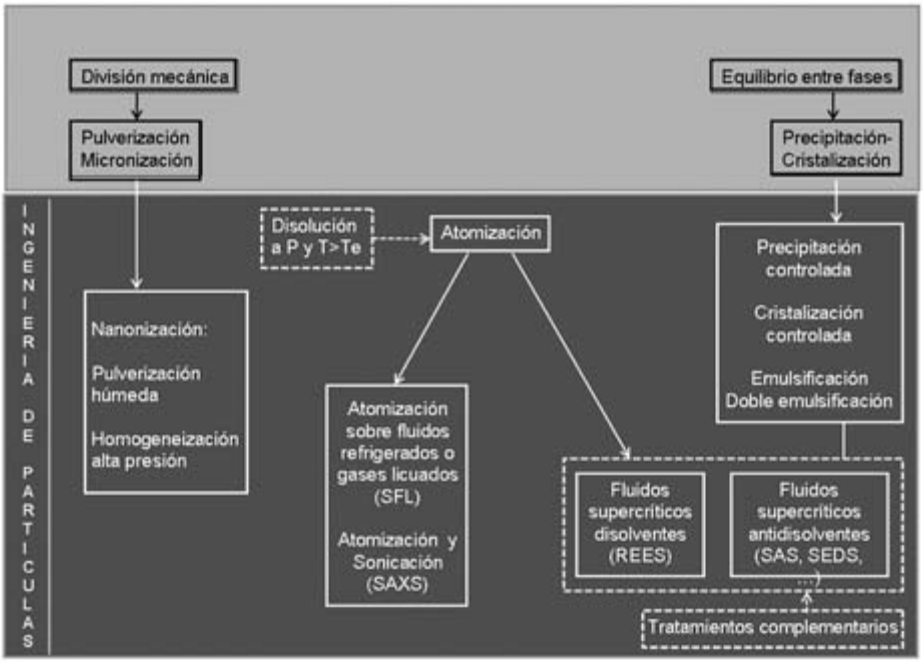


FIGURA 6.2. *Procedimientos de ingeniería de partículas aplicados en I+D de medicamentos.*

do la obtención de partículas de menor tamaño. De manera similar, una reducida concentración de sólido disminuye la probabilidad de que tenga lugar la agregación de las partículas formadas y permite una sobresaturación más uniforme, con efectos reductores sobre el tamaño de partícula del precipitado (26). Finalmente, todo incremento en la intensidad de agitación favorece, también, la formación de partículas de menor tamaño al mejorar la homogeneidad de la sobresaturación e incrementar el número de núcleos (27).

Aunque las técnicas de precipitación son muy simples, no requieren el uso de equipos sofisticados y no someten a los productos a tratamientos enérgicos que pueden comprometer su estabilidad, su uso actual está bastante restringido como consecuencia de ciertas limitaciones entre las que la más importante se refiere a la necesidad de evitar el crecimiento cristalino y -en el caso de que las partículas presenten cierta estructura amorfa que les confiere una mayor velocidad de disolución- la necesidad de mantener esta forma metaestable hasta el momento de su administración (28). Una limitación adicional es que el fármaco debe ser soluble en un disolvente orgánico miscible con el agua, disolvente orgánico que deberá eliminarse del producto acabado.

Pulverización húmeda. Molinos de perlas

Este procedimiento, desarrollado y patentado inicialmente por Liversidge y col. en 1992 (29), fue comercializado posteriormente por Elan Drug Delivery bajo la denominación registrada Nanocrystal®.

Los equipos utilizados para la obtención de nanocristales, los molinos de perlas, tienen una estructura muy similar a los clásicos molinos de bolas. En los molinos de perlas, la cámara de pulverización contiene pequeñas partículas esféricas (perlas) de unos tres milímetros de diámetro, que constituyen el elemento activo en el proceso de pulverización. Las perles pueden estar formadas por diferentes materiales, entre los cuales óxido de zirconio, vidrio y poliestireno fuertemente reticulado son los más frecuentemente utilizados. La reducción del tamaño de las partículas del sólido tiene lugar a través de un doble mecanismo: creación de fuerzas de cizalla de alta energía asociadas al giro del rotor y el impacto de las perlas sobre las partículas del sólido.

La cámara de pulverización se carga normalmente con el fármaco a pulverizar, un agente estabilizante y agua. No obstante, pueden incorporarse otras sustancias auxiliares como azúcares, tampones o sales, con objeto de facilitar el proceso o la aplicación de tratamientos sobre el producto nanonizado (30).

El agente estabilizante es un elemento clave en el proceso ya que debe favorecer la reducción del tamaño de partícula del sólido y dotar a éste de una adecuada estabilidad física. Para que resulte eficaz debe provocar la humectación de la superficie de los cristales del sólido y proporcionarles una barrera de tipo iónico o de tipo estérico. En ausencia de un agente estabilizante adecuado, la elevada energía superficial de las partículas nanométricas provocará su agregación (31). Aunque, hasta el momento, la selección del agente estabilizante es eminentemente empírica, algunos estudios recientes han puesto de manifiesto que la capacidad de estabilización depende de propiedades como la energía superficial o la presencia de ciertos grupos funcionales en su molécula. Como agentes estabilizantes se utilizan productos de empleo tan frecuente en formulación como povidonas, polisorbatos, pluronics o derivados celulósicos (32).

El producto resultante de la aplicación de este proceso es una nanosuspensión de partículas cristalinas, de tamaño habitualmente comprendido entre 100 y 500 nm, recubiertas de una fina película de agente estabilizante y cuya forma depende mayoritariamente de la morfología de los cristales de la materia prima y de sus planos de fractura (30).

En los molinos de perlas, los riesgos de provocar transiciones polimórficas son pequeños, ya que el proceso se desarrolla a temperatura controlada y la presencia de la fase acuosa permite disipar eficazmente el calor generado (33).

La estabilidad física de las nanosuspensiones es elevada, en especial en el caso de fármacos de hidrosolubilidad más reducida, en los que la aparición del clásico efecto Ostwald de envejecimiento (*ripening*) es menos probable (34).

Un aspecto de indudable interés práctico es la posibilidad de eliminación de la fase acuosa de las nanosuspensiones por liofilización, atomización o cualquier otro procedimiento adecuado, para originar un producto seco que se incorpora con facilidad a formas de dosificación sólidas, convencionales o de liberación modificada lo que, adicionalmente, permite incrementar su estabilidad física, alejando el peligro de aglomeración o de crecimiento cristalino (30). Además, los productos liofilizados, previa sterilización y adecuada redispersión, pueden emplearse como formas parenterales.

Una de las escasas limitaciones de esta modalidad de producción de nanocristales se deriva de la larga duración del proceso, que puede extenderse de horas hasta días, y se refiere a la posibilidad de contaminación de los productos como consecuencia de la erosión de las perlas. Aunque se dispone de datos discrepantes al respecto, hoy parece claro que la importancia de esta contaminación está determinada por la naturaleza de los materiales de construcción de las perlas y por la dureza de los sólidos a procesar (35).

Homogeneización a alta presión. Homogeneizadores de pistón

Aunque inicialmente se desarrollaron dos variantes de la homogeneización a alta presión para la obtención de nanocristales, una de ellas, la microfluidificación (36), ha sido prácticamente abandonada para este fin como consecuencia del elevado número de ciclos de homogeneización que es necesario aplicar para obtener el tamaño de partícula deseado y de la excesiva proporción de partículas micrométricas presentes en el producto final. Por ello, hoy la atención se centra en el empleo de homogeneizadores de pistón, técnica introducida y desarrollada por Muller (37) en los años centrales de la década de los noventa, registrada como DissoCube® por la firma SkyePharma, y aplicable para la obtención de nanocristales en medio acuoso. En los primeros años del presente siglo, se amplió su ámbito de aplicación a disolventes no acuosos y a mezclas de agua con disolventes miscibles, tecnología registrada como Nanopure® por la empresa alemana PharmaSol (38).

En los procesos de homogeneización en medio acuoso, una suspensión de fármaco micronizado en una disolución acuosa de un agente estabilizante, se hace pasar a presión -aplicada mediante un pistón- a través de la ranura, muy estrecha (de unas 25 micras), del homogeneizador. Ello produce una fuerte reducción de la presión estática, que cae incluso por debajo de la presión de vapor del agua a esa temperatura, y lleva a la formación y crecimiento de burbujas que «implotan» cuando la suspensión abandona la ranura del homogeneizador, por lo que es la cavitación el mecanismo predominante en la reducción del tamaño de las partículas en suspensión (39-41).

Las características del producto obtenido en los homogeneizadores de pistón pueden modularse ajustando la presión y la temperatura de trabajo y el número de ciclos de homogeneización al que se somete el producto.

Los efectos de la presión son claros: cuanto mayor sea ésta, mayor será la velocidad que alcanza la suspensión en la ranura del homogeneizador, mayor será la caída de presión estática en ella, mayor será el número de burbujas formadas y mayor será la energía disponible para reducir el tamaño de las partículas. En este sentido, cabe señalar que la presión aplicada para la homogeneización raramente supera los 1500 bar.

La evolución de los valores de presión de vapor del agua con la temperatura, convierte en obvios los efectos de esta variable. Por ello, en los homogeneizadores de pistón se disponen intercambiadores de calor que permiten una regulación estricta de la temperatura de trabajo lo que, adicionalmente, permite evitar la posible degradación de productos termolábiles.

En lo que se refiere al número de ciclos de homogeneización, hay que señalar que normalmente es necesario aplicar un considerable número de ciclos, incluso superior a 10 ó 20, para conseguir nanocristales del tamaño requerido. Este hecho tiene su origen en que, a consecuencia de la cortísima duración del paso del producto a través de la ranura del homogeneizador (milisegundos), no todas las partículas del producto se fragmentarán, por lo que resulta imprescindible la repetición del ciclo. También, la aplicación de un elevado número de ciclos de homogeneización puede justificarse por la progresiva homogeneidad en el tamaño de los nanocristales que se consigue a través de su reiteración (42).

Las características de las nanosuspensiones obtenidas en los homogeneizadores de pistón, en cuanto a tamaño y forma de los nanocristales, distribución del agente estabilizante y estabilidad física, son muy similares a las descritas para la técnica Nanocrystal® en párrafos anteriores. Sin embargo, los riesgos de contaminación de los productos por erosión, resultan claramente menores en los procesos de homogeneización (43). Finalmente, las elevadas presiones de tra-

bajo en estos equipos pueden inducir transiciones polimórficas y, con ellas, la presencia en los nanocristales de apreciables fracciones amorfas cuyo carácter metaestable puede reducir la estabilidad física de las nanosuspensiones (44).

En la técnica Nanopure®, el fármaco y el agente estabilizante se disperan en un disolvente no acuoso (como polietilenglicoles de bajo peso molecular) o en una mezcla de agua (en proporciones reducidas) con un disolvente acuoso miscible (etanol, glicerina o propilenglicol) y la dispersión se hace pasar a través de un homogeneizador de pistón.

Aunque pueda resultar sorprendente, la eficacia en la reducción del tamaño de partícula del fármaco no se reduce al bajar la temperatura de trabajo hasta, incluso, valores de -20ºC. Dada la reducida presión de vapor de algunos de los disolventes no acuosos indicados, parece claro que la cavitación clásica (descrita en párrafos anteriores) no es el principal mecanismo de formación de nanocristales. Este hecho abre importantes perspectivas para la aplicación de esta modalidad de homogeneización a productos termolábiles como la azodicarbonamida, que se degrada por homogeneización en medio acuoso (45).

Procedimientos combinados

Como se indicó previamente, uno de los principales problemas que plantea el uso de los métodos de precipitación para la preparación de nanocristales es el relativo al crecimiento cristalino. Partiendo de este hecho, la compañía Baxter introdujo recientemente la tecnología Nanoedge® en la que se combinan una primera etapa de precipitación con otra posterior de alta aportación energética (como sonicación u homogeneización a alta presión) que permite estabilizar y, según reclama la correspondiente patente, recristalizar las fracciones amorfas presentes en los nanocristales obtenidos por precipitación (46).

Quizá, las principales limitaciones de este procedimiento, que resulta especialmente útil para fármacos de elevada temperatura de fusión y de marcada lipofilia, sean las referidas a la necesidad de añadir una nueva etapa al proceso de obtención de nanocrsitales y a las dificultades que encierra la eliminación del o de los disolventes utilizados en la etapa de precipitación.

Recientemente, Moschwitzer y Muller (47) con el fin de reducir el número de ciclos de homogeneización y obtener nanocristales de tamaño especialmente reducido y homogéneo, han propuesto la aplicación de una etapa previa de atomización, que en opinión de los autores, permite en un solo ciclo de homogeneización a alta presión alcanzar los objetivos perseguidos.

MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOCRISTALES

Tamaño y distribución de tamaños de partícula

El tamaño habitualmente requerido para los nanocristales determina que el procedimiento de elección para su medida sea la espectroscopía de correlación fotónica que, junto con el diámetro medio de partícula, suministra una aproximación a la distribución de tamaños a través del índice de polidispersión.

Sin embargo, es sabido que el límite superior de aplicación de este técnica de análisis granulométrico se sitúa alrededor de 1 micra, por lo que resulta recomendable complementar sus resultados con datos procedentes de otras técnicas aplicables a partículas de mayor tamaño (p. ej. método Coulter), que permitan cuantificar la presencia, en los productos nanonizados, de partículas de tamaño micrométrico, en especial si el producto se destina a la administración endovenosa, por los problemas que puede causar por bloqueo de capilares sanguíneos (48).

Forma de las partículas

La microscopía electrónica de trasmisión posibilita el estudio de la forma de las partículas en nanosuspensión, en tanto que la modalidad de barrido permite su observación en estado seco. Además, esta última técnica facilita la detección de aglomerados de nanocristales.

Potencial electrocinético

El interés de este parámetro radica en que la tendencia a la aglomeración de los nanocristales puede reducirse por repulsión electrica o estérica (49).

Jacobs y col. (50) han establecido valores mínimos de potencial electrocinético de -30 mV para nanosuspensiones de tarazepida estabilizadas electrostáticamente y de -20 mV si la estabilización es estérica.

Cristalinidad

Aunque numerosos fármacos conservan su cristalinidad después de reducir el tamaño de sus partículas al intervalo nanométrico, en algunos casos en los nanocristales se encuentra fármaco con estructura amorfa (51), aspecto fácilmente caracterizable con datos procedentes de difracción de rayos X y de calorimetría diferencia de barrido.

Propiedades superficiales

Características de los nanocristales como su hidrofobicidad superficial o su interacción con proteínas, que pueden condicionar su actuación in vivo, pueden estudarse a través de técnicas específicas como la cromatografía de interacción hidrofóbica (52).

Estabilidad

Como ya se ha indicado, uno de los principales problemas de los nanocristales en suspensión es la tendencia que muestran a la aglomeración y al crecimiento cristalino a través del efecto Ostwald de envejecimiento, por lo que resulta imprescindible un estricto seguimiento de su tamaño, utilizando las técnicas ya descritas, hasta el momento de su administración (53). Para minimizar los efectos de estos mecanismos de inestabilidad física, resulta crucial la adecuada selección del agente estabilizante, tanto en cuanto a su naturaleza como en cuanto a la proporción incorporada, para crear una barrera eficaz de tipo electrostático (estabilizantes iónicos) o de tipo estérico (estabilizantes no iónicos) (54).

Aplicaciones farmacéuticas de los nanocristales

Las propiedades de los nanocristales, tanto en forma de nanosuspensión como en estado seco, resultan muy interesantes para su incorporación a diversas formas de dosificación, no sólo por los importantes incrementos en la velocidad de disolución de fármacos poco hidrosolubles, anticipables por su reducido tamaño de partícula. En los siguientes párrafos, se describen algunas de las aplicaciones más relevantes de los nanocristales, derivadas de su incorporación a formas de dosificación de administración oral, parenteral, pulmonar y ocular.

Administración oral

De la observación de las Tablas 6.1 y 6.2 se deduce que la administración oral de nanocristales (obtenidos en molinos de perlas o en homogeneizadores de alta presión), tanto en forma de nanosuspensión como incorporados a formas sólidas, ha permitido alcanzar importantes objetivos. Así, incrementos espectaculares en la biodisponibilidad de algunos fármacos con respecto a la obtenida con suspensiones convencionales o con formulaciones comerciales, notables aceleraciones en la velocidad de absorción y, en algunos casos, una mayor independencia de la biodisponibilidad oral respecto de la ingestión concomitante de alimentos.

Por otra parte, la notable superficie específica de los nanocristales es responsable de su marcada adhesividad (55, 56). Este comportamiento, que sin duda constituye un problema desde un punto de vista tecnológico, puede conducir a aumentos adicionales en la biodisponibilidad oral de algunos fármacos, derivados de la adhesión de los nanaocristales a la pared intestinal y, consecuentemente, de la disolución del fármaco en su lugar de absorción (57). Esta capacidad adhesiva de los nanocristales a la pared intestinal resulta aún más importante en el caso de fármacos utilizados en el tratamiento de patologías que se acompañan de procesos diarreicos, como se ha demostrado para el antibiótico buparvacuona utilizado en el tratamiento de la criptosporidiosis (58).

Para algunos fármacos como ciclosporina A, los pobres resultados obtenidos tras su administacion en forma de nanocristales, se han atribuido a una im-

TABLA 6.1. *Resultados obtenidos en la evaluación biofarmacéutica de formas de dosificación conteniendo nanocristales obtenidos por pulverización húmeda en molino de perlas.*

Fármaco	Tamaño medio (nm)	Estabilizante	Resultados
HO-221	453	Monolaurato de poliglicerina	Aumento del 50-80% en biodisponibilidad en perros respecto del producto micronizado o sin pulverizar
Danazol	169	Polivinilpirrolidona	Incremento de 20 veces en la biodisponibilidad en perros respecto de una suspensión comercial
Danazol	169	Polivinilpirrolidona	Reducción de 6 veces sobre los efectos de los alimentos en la biodisponibilidad respecto de un producto comercial
Naproxeno	270	Pluronic F68	Aumento en la velocidad de absorción respecto del producto micronizado. Reducción de irritación gástrica
Cilostazol	220	Hidroxipropilcelulosa y docusato sódico	Aumento de 5 veces en la biodisponibilidad respecto del producto micronizado o del producto tratado en molino de martillos
Carbendazim	280	—	Reducción a la mitad de la dosis terapéutica
Antiviral 301029	280	Poloxamer 407	Aumento de 4 veces en biodisponibilidad respecto de suspensión micronizada. Aumento en velocidad de absorción

TABLA 6.2. *Resultados obtenidos en la evaluación biofarmacéutica de formas de dosificación orales conteniendo nanocristales obtenidos por homogeneización a alta presión.*

Fármaco	Tamaño medio nanocristales (nm)	Estabilizante	Resultados	Ref.
Ibuprofeno	< 100	Tween 80 y Povidona K25	Importantes aumentos de velocidad de disolución respecto del producto micronizado	65
Nifedipina	300	Methocel E15	Aumento en velocidad de disolución respecto del producto no pulverizado. Evidencias de incremento en solubilidad	66
Ucb-35440-3	182	Methocel E15	Aumento de 4 veces en biodisponibilidad respecto de suspensión. Biodisponibilidad reducida por alimentos	67
Anfotericina B	528	Tween 80 y Pluronic F68	Demostración de actividad antiparasitaria frente a inactividad de forma micronizada	68

portante agregación de los nanocristales a nivel del tracto gastrointestinal (59), aspecto sobre el que, una vez más, el agente estabilizante puede jugar un papel decisivo.

A pesar de las importantes ventajas que pueden derivarse de la administración de numerosos fármacos en forma de nanocristales, hasta el momento sólo cuatro productos, cuyas características se han resumido en la Tabla 6.3, se han introducido en el mercado, todos ellos resultado de la aplicación de la tecnología Nanocrystal®.

TABLA 6.3. *Especialidades farmacéuticas que incorporan el fármaco en forma de nanocristales.*

Especialidad	Fármaco	Forma dosificación	Compañía
Rapamune®	Sirolimus	Comprimidos	Wyhet
Emend®	Aprepitant	Cápsulas	Merck
TriCord®	Fenofibrato	Comprimidos	Abbott
Megace® ES	Megestrol	Suspensión oral	PAR Pharmaceutical

Administración parenteral

La administración parenteral, especialmente endovenosa, de las nanosuspensiones no plantea problemas importantes como consecuencia del reducido tamaño de los nanocristales y de la naturaleza y la proporción de los excipientes que les acompañan (buena parte de los estabilizantes más utilizados están aprobados para adminisración parenteral). Así, para el paclitaxel se han descrito incrementos importantes en su tolerancia cuando se administra como nanosuspensión frente a la obtenida con el producto comercializado Taxol, que incorpora Cremophor EL y etanol en su formulación (69).

En lo que se refiere al requisito de esterilidad, además de la elaboración aséptica, es posible acudir a la aplicaciçon de procedimientos tan diversos como la filtración, la radiación gamma y, en ciertos casos, el calor (70).

Un aspecto de especial trascendencia es que los nanocristales administrados por vía endovenosa muestran cierta capacidad de direccionamiento -lógicamente antes de que tenga lugar su disolución en el torrente circulatorio- hacia órganos como hígado y bazo, donde son reconocidos y captados por células fagocíticas (71).

Administración pulmonar

Las nanosuspensiones reunen una serie de características muy favorables para la administración pulmonar de fármacos: El reducido tamaño de los nanocristales permite conseguir una distribución más homogénea del fármaco en el producto nebulizado, la referida adhesividad de los nanocristales mejora su fijación en las zonas de absorción y el valor incrementado del coeficiente de solubilidad del fármaco permite pronosticar una absorción pulmonar más rápida.

Jacobs y col (72) han demostrado, además, que la nebulización de nanosuspensiones de budesonida no produce alteraciones significativas en el tamaño de los nanocristales.

Administración ocular

Una vez más, el incremento en el valor del coeficiente de solubilidad y de la adhesividad del fármaco que acompañan a una reducción de su tamaño de partícula a nivel nanométrico, resultan muy positivos para la administración oftálmica de nanaosuspensiones, que permiten incrementar y prolongar la absorción

ocular. En uno de los escasos estudios publicados sobre este tema, Rosario y col (73) demostraron una notable tolerancia ocular de nanosuspensiones de ibuprofeno en conejos y la superioridad, en cuanto a eficacia y a duración de efectos, de esta formulación sobre algunos preparados oftálmicos comerciales.

Perspectivas futuras

En páginas anteriores, se ha pretendido plasmar la importancia de las ventajas de índole tecnológica, biofarmacéutica y terapéutica asociadas a la administración de algunos fármacos en forma de nanocristales. Su fácil incorporación a diversas formas de dosificación y vías de administración, las espectaculares mejoras conseguidas en su biodisponibilidad y en su eficacia terapéutica, así como su apreciable capacidad de direccionamiento a determinados órganos desde el compartimento sanguíneo, son buenos ejemplos de ello.

También se ha pretendido poner de manifiesto la importancia de una adecuada elección del agente estabilizante para garantizar la estabilidad física de los nanocristales. En este sentido, recientemente se ha demostrado que la naturaleza del agente estabilizante puede condicionar su actuación *in vivo*. Así, Muller y col (74) mostraron que la interacción de los nanocristales con las proteínas plasmáticas depende del agente estabilizante o, más correctamente, de las propiedades superficiales de los nanocristales y acuñaron el concepto de *adsorción diferencial de proteínas*. En la modificación de las propiedades superficiales de los nanocristales, con productos que les dote de capacidad específica de direccionamiento en el organismo, siguiendo aproximaciones similares a las aplicadas en liposomas (14), se encuentra, sin duda, una de las principales líneas de desarrollo en el campo de los nanocristales tal como se ha puesto de manifiesto al utilizar nanocristales de óxido de hierro (Fe304) que se recubren con ácido 2-3 dimercaptosuccinico (DMSA) el cual permite establecer una unión estable via quelato con el nanocristal y una reticulación a través de puentes disulfuro, tal como se puede observar en la Figura 6.3. Por otra parte, a éste sistema es posible incorporarle un anticuerpo que oriente el sistema hacia células tumorales incrementándose, de forma muy importante, la imagen obtenida por RMN. La validez de este sistema ha sido comprobada in vivo utilizando como anticuerpo trastuzumab en tumores que tienen sobreexpresado HER2/neu (75).

La aplicación de las tecnologías de nanocristales a fármacos de origen biotecnológico, que plantean problemas específicos de estabilidad y de toxicidad (76), constituye otro reto importante de cara al futuro.

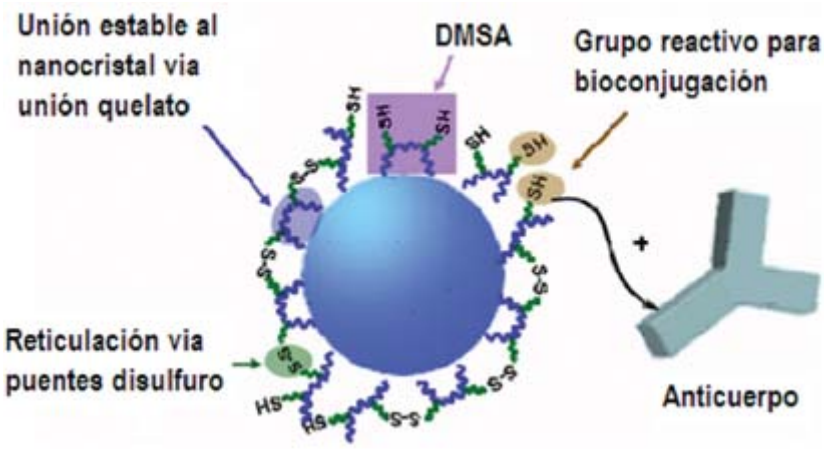


FIGURA 6.3. *Representación esquemática del recubrimiento de nanocristales de óxido de hierro con ácido 2-3 dimercaptosuccínico.*

BIBLIOGRAFÍA

(1) Lipinski, C. (2002) Poor aqueous solubility -an industry wide problema in drug discovery. *Am. Pharm. Rev.* 5: 82-85.

(2) Yu, L.X., Amidon, G.L., Polli, J.E., Shao, H., Metha, M.V., Conner, D.P., Shah, V.P., Lesko, L.J., Chen, M.L., Lee, V.H. & Hussain, A.S. (2002) Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. *Pharm. Res.* 19: 921-925.

(3) Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.-Y., Smith, B.R., Ward, K.W. & Kopple, K.D. (2002) Molecular properties that influence oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* 45: 2615-2623.

(4) Bittner, B. & Mountfield, R.F. (2002) Intravenous administration of poorly soluble new drug entities in early drug discovery. The potential impact of formulation on pharmacokinetic parameters. *Cur. Opin. Drug Discovery and Dev.* 59-71.

(5) Akers, M.J. (2002) Excipient-drug interactions in parenteral formulations. *J. Pharm. Sci.* 91: 2283-2300.

(6) Nakano, M. (2000) Places of emulsions in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45: 1-4.

(7) Floyd, A.G. (1999) Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm. Sci. Tech.* 4: 134-143.

(8) Mohammed, A.R., Weston, N. & Coombes, A.G.A. (2004) Liposome formulation of poorly water soluble drugs. Optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *Int. J. Pharm.* 285: 23-34.

(9) Pace, S., Pace, G.W., Parikh, I. & Mishra, A. (1999) Novel injectable formulations of insoluble drugs. *Pharm. Tech.* 23: 116-134.

(10) Lawrence, M.J. & Rees, G.D. (2002) Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Ad. Drug Deliv.* 45: 89-121.

(11) Stella, V.J. & Rajewski, R.A. (1997) Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.* 14: 556-567.

(12) Loftsson, T. & Brewster, M.E. (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* 85: 1017-1025.

(13) Gregoriades, G. (1995) Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *TIBTECH.* 13: 527-537.

(14) Allen, T.M. (1997) Liposomes: opportunities in drug delivery. *Drugs.* 54: 8-14.

(15) Leuner, C. & Dressman, J. (2000) Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50: 47-60.

(16) Serajuddin, A.T.M. (1999) Solid dispersions of poorly water-soluble drug: early promises, subsequent problems and recent breakthroughs. *J. Pharm. Sci.* 88: 1058-1066.

(17) Muller, R.H. & Peters, K. (1998) Nanosuspesions for the formulation of poorly soluble drugs I. Preparation by a size-reduction technique. *Int. J. Pharm.* 160: 229-237.

(18) Rasenack, N. & Muller, B.W. (2003) Micro-size drug particles: common and novel micronization techniques. *Pharm. Dev. Technol.* 9: 1-13.

(19) Fincher, J.H. (1968) Particle size of drugs and its relationship to absorption and activity. *J. Pharm. Sci.* 57: 1825-1835.

(20) Dokoumetzidis, A. & Macheras, P. (2006) A century of dissolution research: From Noyes-Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *Int. J. Pharm.* 321: 1-11.

(21) Mosharraf, M. & Nystrom, C. (1995) The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of micronized practically insoluble drugs. *Int. J. Pharm.* 122: 35-47.

(22) Kesisoglon, F., Panmai, S. & Wu, Y. (2007) Application of nanoparticles in oral delivery of immediate release formulations. *Curr. Nanosc.* 3: 183-190.

(23) Gassmann, P., List, M., Schweitzer, A. & Sucker, H. (1994) Hydrosols-alternatives for parenteral application of poorly water soluble drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40: 64-72.

(24) Thies, J. & Muller, W. (1998) Size controlled production of biodegradable microparticles with supercritical gases. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45: 67-74.

(25) Rasenack, N. y Muller, W. (2002) Dissolution rate enhancement by in situ micronization of poorly water-soluble drugs. *Pharm. Res.* 19: 1894-1900.

(26) Zhang, J., Shen, Zh., Zhong, J. y col. (2006) Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitacion method without surfactants. *Int. J. Pharm.* 323: 153-160.

(27) Doroumis, D. & Fahr, A. (2006) Nano- and micro-particulate formulations of poorly water-soluble drugs by using a novel optimized technique. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63: 173-175.

(28) Zhong, J., Shen, Zh., Yang, Y y col. (2005) Preparation and characterization of uniform nanosized cephradine by combination of reactive precipitation and liquid antisolvent precipitation under high gravity environment. *Int. J. Pharm.* 301: 286-293.

(29) Liversidge, G.G., Cundy, K.C., Bishop, J.F. & Czekai, D.A. (1992) Surface modified drug nanoparticles. U.S. Patent 5,145,684.

(30) Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G. & Cooper, E.R. (2003) Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 18: 113-120.

(31) Choi, J.-V., Yoo, J.Y., Kwak, H.-S., Nam, B.U. & Lee, J. (2005) Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions. *Curr. Appl. Phys.* 5: 472-474.

(32) Kibbe, A.H. (2000) Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Edition. AphA and PhP, Washington, DC.

(33) Liversidge, G.G. & Cundy, K.C. (1995) Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int. J. Pharm.* 125: 91-97.

(34) Bowman, B.J., Ofner, C.M. & Schott, H. (2005) Colloidal dispersions. En Gennaro A.R. (Ed), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., Lippincott-Williams, New York, 2005, pp. 293-318.

(35) Buchnmann, S., Fischli, W., Thiel, F.P. & Alex, R. (1996) Aqueous microsuspension, an alternative intravenous formulation for animal studies. 42-nd Annual Congress of the International Association for Pharmaceutical Technology (APV), Mainz p. 124.

(36) Parickh, I. & Selvaraj, U. (1999) Composition and method of preparing microparticles of water-insoluble substances, United States Patent 5,922,355, Research Triangle Pharmaceuticals (Durham, NC), USA.

(37) Müller, R.H., Becker, R., Kruss, B. & Peters, K. (1999) Pharmaceutical nanosuspensions for medicament administration as systems with increased saturation solubility and rate of solution. United States Patent 5, 858, 410, USA.

(38) Müller, R.H., Mäder, K. & Krause, K. (2000) Verfahren zur schonenden Herstellung von hochfeinen Micro-/Nanopartikeln, PCT Application PCT/EP00/06535, Germany.

(39) Krause, K. & Müller, R.H. (2001) Production and Characterization of Highly Concentrated Nanosuspensions by High Pressure Homogenizacion. *Int. J. Pharm.* 214: 21-24.

(40) Jacobs, C., Kayser, O. & Müller, R.H. (2000) Nanosuspensions as a New Approach for the Formulation for the Poorly Soluble Drug Tarazepide. *Int. J. Pharm.* 196: 161-164.

(41) Liedtke, S., Wissing, S., Müller, RH y col. (2000) Influence of high pressure homogenization equipment on nanodispersions characteristics. *Int. J. Pharm.* 196: 183-185.

(42) Gao, L., Zhang, D. & Chen, M. (2008) Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J. Nanopart. Res.* 10: 845-862.

(43) Krause, K.P., Kaiser, O., Mader, K. y col. (2000) Heavy metal contamination of nanosuspensions produced by high-pressure homogenization. *Int. J. Pharm.* 196: 169-172.

(44) Muller, R.H. & Bohm, B.H.I. (1998) Nanosuspensions. En: Emulsions&Nanosuspensions For the Formulation of Poorly Soluble Drugs, Muler R.H., Bentia S. y Bohm B.H.I. Eds. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, pp. 149-174.

(45) Kharb, V., Meenakshu, B., Dureja, H. & Kaushik, D. (2006) Nanoparticle Technology for the Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs. *Parm. Tech.*, February 2006, pp 82-92.

(46) Kipp, J.E., Wong, J.C.T., Doty, M.J & Rebbeck, C.L. (2003) Microprecipitation Method For Preparing Submicron Suspensions, United States Patent 6,607,784, Baxter International Inc. (Deerfield, IL), USA.

(47) Möschwitzer, J. & Müller, R.H. (2006) New method for the effective production of ultrafine drug nanocrystals. *J. Nanosc. Nanotech.* 6: 3145-3153.

(48) Washington, C. (1992) Particle size analysis in pharmaceutics and other industries. Theory and practice. Ellis Horwood, New York, cps. 4 y 7.

(49) Malmstan, M. (2002) Surfactants and polymers in drug delivery. M. Dekker, New York, pp. 276-278.

(50) Jacobs, C., Kayser, O. & Muller, R.H. (2000) Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide. *Int. J. Pharm.* 196: 161-164.

(51) Zhang, D.R., Tan, T.W., Gao, L. y col. (2007) Preparation of Azithromycin Nanosuspensions by High Pressure Homogenization and its Physicochemical Characteristics Studies. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33: 569-575.

(52) Wallis, K.H. & Muller, R.H. (1993) Determination of the surface hydrophobicity of colloidal dispersions by mini-hydrophobic interaction chromatography. *Pharm. Ind*. 55: 1124-1128.

(53) Drews, T.O. & Tsapatsis, M. (2007) Model of the evolution of nanoparticles to crystals via an aggregative growth mechanism. *Micropor. Mesopor. Mat*. 101: 97-107.

(54) Muller, R.H. & Jacobs, C. (2002) Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimization and long-term stability. *Int. J. Pharm*. 237: 151-161.

(55) Duchene, D. & Ponchel, G. (1997) Bioadhesion of solid oral dosage forms, why and how? *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 44: 15-23.

(56) Ponchel, G., Montisci, M.J., Dembri, A. y col. (1997) Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastrointestinal tract. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 4: 25-31.

(57) Liversidge, G.G. (1996) Drug nanoparticles for impooved drug delivery. 23nd International Symposium of Controlled Release of Bioactive Materials, Kyoto.

(58) Kayser, O. (2001) A new approach for targeting to *Cryptosporidium parvum* using mucoadhesive nanosuspensions: research and applications. *Int. J. Pharm*. 214: 83-85.

(59) Muller, R.H., Rungea, S., Ravelli V. y col. (2006) Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *Int. J. Pharm*. 317: 82-89.

(60) Kondo, N., Iwao, T., y col. (1993) Improved oral absorption of a poorly water-soluble drug, HO-221, by wet-bead milling producing particles in submicron region. *Chem. Pharm. Bull*. 41: 737-740.

(61) Liversidge, G.G. & Conzentino, P. (1995) Drug particle size reduction for decreasing gastric irritancy and enhancing absorption of naproxen in rats. *Int. J. Pharm*. 125: 309-313.

(62) Jinno, J., Kamada, N., Miyake, M., Yamada, K., Mukai, T., Odomi, M., Toguchi, H., Liversidge, G.G., Higaki, K. & Kimura, T. (2006) Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle. *J. Control. Release*. 111: 56-64.

(63) Jia, L., Wong, H., Wang, Y., Garza, M. & Weitman, S.D. (2003) Carbendazim: Disposition, cellular permeability, metabolite identification, and pharmacokinetic comparison with its nanoparticle. *J. Pharm. Sci*. 92: 161-172.

(64) Jia, L., Wong, H., Cerna, C. & Weitman, S.D. (2002) Effect of nanonization on absorption of 301029: ex vivo and in vivo pharmacokinetics correlations determined by liquid chromotagrafy/mass spectrometry. *Pharm. Res*. 19: 1091-1096.

(65) Hecq, J., Deleers, M., Fanara, D., Vranckx, H. & Amighi, K. (2005) Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *Int. J. Pharm.* 299: 167-177.

(66) Kocbek, P., Baumgartner, S. & Kristl, J. (2006) Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 312: 179- 186.

(67) Hecq, J., Deleers, M., Fanara, D., Vranckx, H., Boulanger, P., Le Lamer, S. & Amighi, K. (2006) Preparation and in vitro/in vivo evaluation of nano-sized crystals for dissolution rate enhancement of ucb-35440-3, a highly dosed poorly water-soluble weak base. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64: 360-368.

(68) Kayser, O., Olbrich, C., Yardley, V. y col. (2003) Formulation of anphotericin B as nanosuspension for oral administration. *Int. J. Pharm.* 254: 73-75.

(69) Böhm, B.H.L. & Müller, R.H. (1999) Lab-scale production unit design for nanosuspensions of sparingly soluble cytotoxic drugs. *Pharm. Sci. Tech. Today.* 2: 336-339.

(70) Na, G.C., Stevens, H.J., Yuan, B. y col. (1999) Physical Stability of ethyl diatrizoate nanocrystalline suspension in steam sterilization. *Pharm. Res.* 569-574.

(71) Goppert, T.M. & Muller, R.H. (2005) Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *Int. J. Pharm.* 302: 172-186.

(72) Jacobs, C. & Muller, R.H. (2002) Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. *Pharm. Res.* 19: 189-194.

(73) Rosario, P., Caudio, B., Piera, F. y col. (2002) Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. *Eur. J. Pharm.* 16: 53-61.

(74) Müller, R.H. & Schmidt, S. (2002) PathFinder technology for the delivery of drugs to the brain. *New Drugs.* 2: 38-42.

(75) Young-Wook, J., Jung-Tak, J. & Jinwoo, C. (2006) Nanocrystals and their biomedical applications: Bull. *Korean Chem. Soc.* 27: 961-971.

(76) Muller, R.H. & Keck, C.M. (2004) Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs -a rewiew of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J. Biotech.* 113: 151-170.

7. Nanopartículas metálicas: oro

SONIA AL-QADI Y CARMEN REMUÑÁN-LÓPEZ

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de metales nobles y, más específicamente, las nanopartículas de oro (AuNPs), exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su «tamaño nanométrico». Destacan especialmente sus peculiares e inesperadas propiedades fototérmicas, por las que al ser activadas en presencia de luz láser, desprenden calor, actuando como auténticos «nano-calefactores». Las AuNPs pueden ser producidas con distintos tamaños y formas y ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético…). Por todo ello, las AuNPs despiertan un gran interés en elcampo de la biomedicina.

Las AuNPs presentan un extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos en el tratamiento del cáncer, así como para la elaboración de nanoestructuras útiles para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas terapéuticas y en terapia génica (vehiculización de plásmidos, DNA, RNA…) (1-3). También destaca la utilidad de las AuNPs en la elaboración de «sistemas transportadores inteligentes» que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo, la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya que ésta es desencadenada por un estímulo biológico interno (por ejemplo una variación en la concentración de glutatión entre el exterior y el interior de la célula) (4, 5) o por activación de un estímulo externo (por ejemplo luz láser) (6, 7).

En los últimos años, la comunidad científica ha dirigido notables esfuerzos a la investigación y aplicación de las AuNPs en la detección precoz, diagnóstico y tratamiento del cáncer (3, 8-17), tal y como lo demuestra el gran volumen

de excelentes trabajos de investigación que están siendo publicados en este campo. En este sentido, es preciso subrayar el excepcional interés de la estrategia dirigida a diseñar nanoplataformas «duales», en las que se combinan -gracias a la utilización de AuNPs-, los principios de diagnóstico y terapia del cáncer.

En este capítulo de revisión analizaremos las propiedades más interesantes de las AuNPs desde el punto de vista de sus aplicaciones terapéuticas y, seguidamente, abordaremos los recientes avances recogidos en la bibliografía tanto en lo que se refiere a su aplicación en fototerapia térmica y vectorización selectiva del cáncer así como a su utilización en la elaboración de sistemas de liberación de fármacos, proteínas terapéuticas y material genético.

UTILIZACIÓN DEL ORO CON FINES TERAPÉUTICOS

La utilización de oro con fines médicos no es nueva, sino que se remonta a la antigüedad, existiendo constatación de la utilización de oro coloidal en China en 2500 AC. En el siglo XVI el oro era utilizado para tratar la epilepsia y a principios del siglo XIX era el fármaco de elección para el tratamiento de la sífilis. El descubrimiento por *Robert Koch* del efecto bacteriostático del cianuro de oro frente al bacilo de la tuberculosis, marca el comienzo su utilización en medicina moderna siendo introducido en la terapia de la tuberculosis en 1920 (1, 18-20). Una de las indicaciones actuales más importantes del oro es en el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades reumáticas, incluyendo psoriasis y lupus eritematoso (2, 21-22). En el tratamiento de la artritis reumatoide en principio se utilizaron tiolatos (tiomalato, tioglucosa…) de oro que eran inyectados intramuscularmente en forma de solución. Pero estos compuestos, que experimentaban una rápida distribución a órganos como el riñón, hígado y bazo, no estaban exentos de poder causar desórdenes sanguíneos así como nefro- y hepatotoxicidad. Por este motivo se introdujo en 1985 una segunda generación de fármacos de oro conteniendo ligandos fosfina, que eran más liofílicos y permanecían más tiempo en circulación, reduciéndose de manera significativa la nefrotoxicidad (23, 24).

A raíz del descubrimiento de la actividad antitumoral del cisplatino en 1969, que promovió, la investigación de otros metales con el mismo fin y fue identificada la actividad antitumoral del oro (25), especialmente de su complejo con fosfina (24, 26), el cual presenta, sin embargo, toxicidad cardiovascular que impide de su utilización en clínica. Es de destacar el reciente descubrimiento por *Bhattacharya y Mukherjee* (1) de las propiedades anti-angiogénicas de las

AuNPs, lo que abre interesantísimas perspectivas de cara a su utilización en terapias del cáncer.

En las pasadas décadas también se puso de manifiesto la actividad antimicrobiana, antimalárica y anti-HIV de diversos complejos orgánicos de oro (2, 22, 27, 28). Otras aplicaciones médicas del oro incluyen su utilización en dispositivos médicos tales como marcapasos y «stents», así como implantes de oído y odontología (1, 2).

INTERÉS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las AuNPs presentan, en principio, una baja toxicidad y, como acabamos de comentar, unas propiedades peculiares e increíblemente interesantes las cuales pueden ser, modificadas mediante su funcionalización con múltiples ligandos, con la finalidad de obtener nanosistemas óptimos para las distintas aplicaciones terapéuticas.

Biocompatibilidad y baja toxicidad

Es muy importante disponer de información fiable acerca del perfil de toxicidad *in vivo* de las AuNPs aisladas y formando parte de nanoconjugados y otros nano-transportadores, de cara a su posible aplicación en clínica.

En la sección anterior acabamos de exponer que el oro coloidal, que presenta una elevada estabilidad química, ha sido utilizado históricamente con fines médicos. En consecuencia, de entrada cabría esperar que las AuNPs presentasen una baja toxicidad y elevada biocompatibilidad. Efectivamente, de acuerdo con *Connor y col*, los núcleos de oro de las nanopartículas son inertes y no-tóxicos (29). Sin embargo, en la bibliografía reciente existen discrepancias acerca de su citotoxicidad, que podrían guardar relación con los diferentes tamaños y formas de las AuNPs investigadas así como con los distintos agentes empleados para su estabilización y funcionalización, los cuales otorgan a las AuNPs características superficiales distintas.

En un estudio que tuvo por objeto determinar la citotoxicidad e inmunogenicidad de las AuNPs frente a células macrofágicas RAW264.7, se observó que las AuNPs no son tóxicas y no dan lugar a la secreción de citoquinas proinflamatorias TNF-α y IL1-β, siendo, además, internalizadas por los cuerpos lisosomales dispuestos en forma perinuclear. Estos resultados subrayan las propieda-

des no citotóxicas y no inmunogénicas de las AuNPs y su biocompatibilidad, corroborando su excelente potencial en nanoinmunología, nanobiotecnología y nanomedicina (30).

Una investigación *in vivo* en la que se evaluó la biodistribución de AuNPs tras su inyección intravenosa (AuNPs con tamaños 2 y 4 nm) y peritoneal (30 nm) a ratones (rastreo a los tiempos 1, 4 y 24 h), reveló que las AuNPs son captadas en cierta medida por la membranas celulares por endocitosis, no observándose otros mecanismos no-endocíticos. Además, independientemente de su tamaño, las AuNPs son internalizadas principalmente por las células Kupffer en el hígado y, en menor medida, por los macrófagos existentes en otros órganos como el bazo. Las AuNPs no parecen atravesar la barrera placentaria ni la barrera que protege el cerebro. Es interesante destacar que no se observa acumulación de AuNPs en otros órganos analizados como riñón, cerebro, pulmón, ovarios, placenta o hígado fetal y que las AuNps de menor tamaño (2 nm) parecen ser eliminadas no sólo por endocitosis macrofágica, sino también por simple filtración glomerular en orina (31).

Pan y col. determinaron el efecto del tamaño de partícula sobre la citotoxicidad de las AuNPs en diversas líneas celulares. Para ello, recurrieron a AuNPs solubles en agua estabilizadas con derivados de trifenilfosfina, con un tamaño entre 0.8 y 15 nm. y llevaron a cabo un estudio sistemático de citotoxicidad de estas AuNPs en cuatro líneas celulares representativas de los principales tipos funcionales (con función barrera y fagocítica): fibroblastos de tejido conectivo, células epiteliales, macrófagos y células melanoma. Estos autores demostraron que la respuesta y el mecanismo de muerte celular dependen del tamaño, siendo todas las células investigadas más sensibles a las AuNPs de 1.4 nm, variando los valores de IC_{50} entre 30 y o 56 □M dependiendo del tipo de célula. En contraste, las AuNPs de 15 nm de tamaño y de tiomalato de oro resultan no tóxicas hasta, respectivamente, concentraciones 60 y 100 veces superiores (32).

Se ha demostrado que las características superficiales de las AuNPs influyen en su toxicidad. Las nanoestructuras catiónicas presentan mayor toxicidad que las aniónicas: las nanopartículas aniónicas con núcleo de tamaño 2 nm son prácticamente no tóxicas mientras que las equivalentes catiónicas son moderadamente tóxicas encontrándose la toxicidad probablemente relacionada con la lisis celular (mediada inicialmente por una unión electrostática) dependiente de la concentración (33). Se observó que AuNPs (con forma de nanocilindros) que habían sido estabilizadas con bromuro de hexadecil-trimetilamonio (BHTA) mostraban una fuerte citotoxicidad, por lo que se procedió a su modificación con polietilenglicol (PEG) mediante adición de PEG-SH a la solución anterior

y eliminación del exceso de BHTA mediante diálisis. Se comprobó que las AuNPS-PEGiladas muestran una superficie próxima a la neutralidad y una baja toxicidad *in vitro*. Además, cuando se administran por vía intravenosa a ratones, al cabo de 30 minutos, el 54% de las AuNPs-PEGiladas aparece en sangre, mientras que la mayoría de las AuNPs que habían sido estabilizadas con BHTA se localizan en el hígado (34).

Facilidad de síntesis y multifuncionalidad

Las AuNPs se pueden preparar fácilmente, obteniéndose sistemas coloidales monodispersos estables con un tamaño entre 1 nm y 150 nm y una distribución de tamaños bien controlada.

En la bibliografía se recogen distintos tipos de AuNPs, preparadas utilizando diversas técnicas, que se diferencian en el tamaño, la forma y las propiedades físicas. En la Figura 7.1 se representan algunos ejemplos de estas AuNPs y sus denominaciones: *nanoesferas, nanocilindros, nanocubiertas, nanojaulas, nanopartículas y «SERS»*.

Las *nanoesferas* de oro de 2-100 nm de diámetro pueden ser obtenidas por reducción controlada de cloruro de oro usando distintos agentes reductores y condiciones. *Faraday* fue el primero en preparar en 1857 oro coloidal por reducción del cloruro de oro con fósforo, atribuyendo el color rojo resultante a la obtención de partículas de tamaño muy pequeño. Años después, *Mie* corroboró que el color del oro coloidal es dependiente del tamaño. Desde entonces y especialmente durante los últimos años, se han dirigido importantes esfuerzos a la

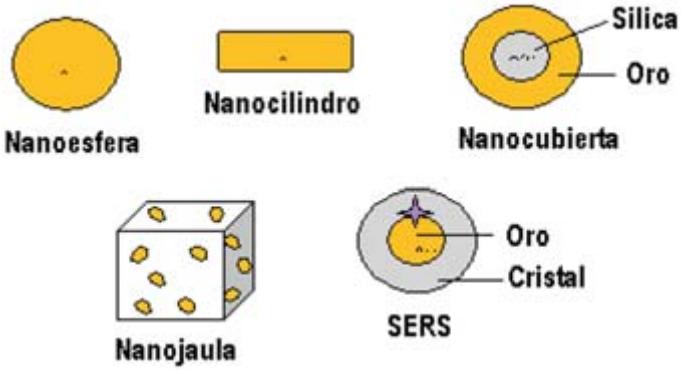


FIGURA 7.1. *Diversas nanoestructuras conteniendo oro.*

preparación por reducción de sales de oro -utilizando generalmente citrato como agente reductor y en presencia de agentes estabilizantes que previenen la aglomeración-, de AuNPs prácticamente monodispersas y de tamaño controlado (35-39). Se comprobó que la relación de citrato/oro y la velocidad de adición del agente reductor pueden influir en el tamaño de las AuNPs obtenidas: cuanto más rápida es la adición del agente reductor, más pequeñas y monodispersas son las AuNPs) (38).

Se ha recurrido a la utilización de dendrímeros (40-44) y copolímeros bloque biocompatibles (45) para obtener AuNPs estéricamente estabilizadas en solución acuosa y más biocompatibles, cuyo tamaño y forma se puede controlar fácilmente (en el segundo de los sistemas) por modificación de parámetros de síntesis tales como la composición del bloque y las concentraciones relativa/absoluta del copolímero bloque y el cloruro de oro.

Para la obtención de AuNPs con formas distintas a la esférica se han utilizado diferentes procedimientos; por ejemplo técnicas de síntesis electroquímica o deposición electroquímica de oro en el interior de los poros de plantillas de policarbonato o alúmina, síntesis mediada por semillas o procedimientos de bioreducción, han permitido obtener AuNPs con forma de *nanocilindro*. Las AuNPs tipo *nanocubierta* pueden ser obtenidas por técnicas de recubrimiento de sílica o *beads* de polímero con cubiertas de oro de espesor variable (17).

Se discute sobre cual es el tipo de AuNP más adecuado de cara a su aplicación en terapéutica. Así, se encontró que la captación intracelular de las AuNPs depende de su forma y tamaño (46-47). Las eficacias de las razones absorción/dispersión y las longitudes de resonancia óptica fueron calculadas para tres tipos distintos de AuNPs *(nanoesferas*, *nanocubiertas* y *nanocilindros*), encontrándose que el estrecho rango de los picos de resonancia de las nanoesferas (~ 520-550 nm) podría limitar su aplicación *in vivo*, al contrario de lo que sucede con las *nanocubiertas* y los *nanocilindros* (15). Por otra parte, las nanocubiertas de oro, huecas en su interior, son apropiadas para encapsular enzimas como peroxidada de rábano, que mantienen la actividad cuando se incorporan al interior de estas AuNPs pero no cuando se asocia a AuNPs sólidas (48).

Las AuNPs presentan una elevadísima área superficial, por lo que pueden ser fácilmente funcionalizadas y bioconjugadas, modificando sus propiedades superficiales. Una AuNP de 2 nm de diámetro de núcleo podría, en principio, ser conjugada a ~ 100 moléculas en los ligandos disponibles (n = ~ 108) (49). Por ejemplo, recientemente *Gibson y col*. anclaron ~ 70 moléculas del agente quimioterapéutico paclitaxel en una AuNP de 2 nm de diámetro (50).

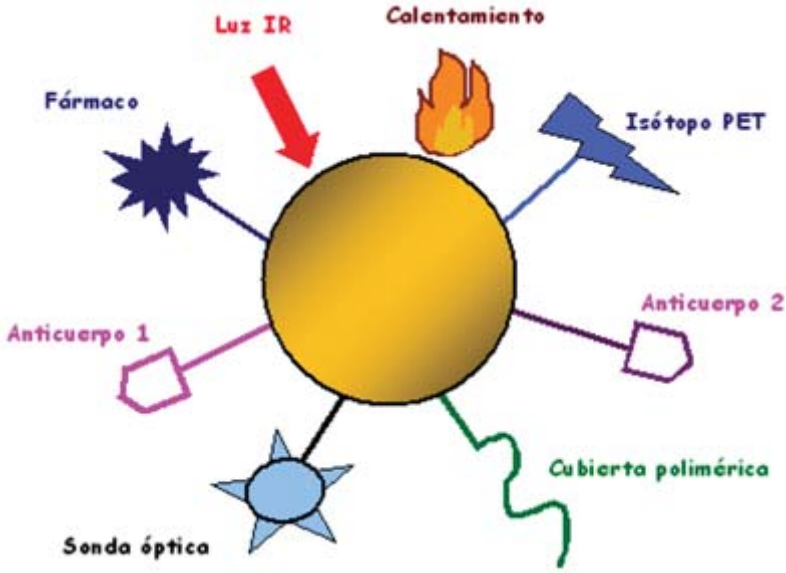


FIGURA 7.2. *Nanopartícula de oro multifuncional que incorpora ligandos de vectorización, diagnóstico por imagen y entidades terapéuticas entre otros. En el esquema se incluye el calentamiento de la nanopartícula (efecto hipertémico) desencadenado por una fuente de radiación luminosa (láser). Únicamente son necesarios los componentes seleccionados para cada aplicación.*

La funcionalización de las AuNPs se realiza generalmente mediante enlaces «tiol» (51), si bien también muestran afinidad por los grupos amino, fosfito y bisulfito. Numerosas moléculas han sido ligadas a la superficie de las AuNPs con distintos propósitos, ampliando su rango de aplicación. Se pueden utilizar procedimientos de modificación post-sintética (52) para funcionalizar la superficie de la partícula con porciones biocompatibles tales como oligo(etilenglicol) (OEG) y poly(etilenglicol) (PEG) (52-60).

Ejemplos de estrategias de funcionalización de las AuNPs de aplicación en terapia del cáncer son la conjugación con PEG-tiolado para conseguir una vectorización pasiva hacia células tumorales (aumenta el tiempo de vida media en el torrente sanguíneo y mejora de la permeabilidad y del efecto de retención en el tumor) (16, 34, 61); y la utilización de anticuerpos específicos de biomarcadores moleculares sobreexpresados en la superficie de células cancerígenas (17, 62) o la utilización de péptidos con propiedades de reconocimiento específico de componentes intracelulares (63). Estos pueden ser conjugados directamente a las AuNPs o mediante puentes de PEG tiolado.

En la Figura 7.2 se representa una AuNP esférica multifuncionalizada con posibles ligandos: fármacos, anticuerpos de vectorización, polímero, sondas de diagnóstico por imagen, ...

Propiedades fototérmicas

En la escala nanométrica, las propiedades electromagnéticas, ópticas y fototérmicas de los metales nobles difieren enormemente de las de sus correspondientes producto a granel. Por ejemplo las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan una coloración «rojo vino» mientras que el correspondiente oro a granel es de color amarillo.

La peculiaridad de las propiedades ópticas y fototérmicas de las AuNPs proviene de las oscilaciones resonantes de sus electrones libres en presencia de luz («Resonancia localizada de plasmón de superficie»), gracias a la cual las nanopartículas pueden radiar luz (*Mie scattering*) o absorber luz que se transforma rápidamente en calor. En efecto, las AuNps emiten un intenso calor cuando son estimuladas con la frecuencia correcta de luz láser u otra fuente de calor (microondas, radiofrecuencia, ultrasonidos…); así una colección de pequeñas AuNPs puede calentar localmente un área de mil veces su tamaño, actuando como auténticos «calefactores nanoscópicos activados por la luz».

El primer proceso encuentra una gran utilidad en el diagnóstico por imágenes (la aplicación más desarrollada hasta la fecha para las AuNPs); mientras que el segundo mecanismo ha abierto grandes expectativas principalmente en el tratamiento fototérmico (hipertérmico) láser selectivo de las células tumorales, pero también en la liberación de moléculas activas «a demanda» en lugares específicos del organismo, en la destrucción de virus y bacterias y en la desnaturalización de proteínas y ácidos nucléicos (3, 64).

Este singular comportamiento fototérmico de las AuNPs se encuentra muy influenciado por el tamaño, forma y propiedades superficiales de las AuNPs (65, 66), motivo por el cual en los últimos años ha habido un resurgimiento de la investigación de las rutas de síntesis y funcionalización de las AuNPs, al objeto de obtener nanopartículas con características idóneas para los distintos fines.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

En esta sección revisaremos las aplicaciones más interesantes y prometedoras de las AuNPs desde el punto de vista terapéutico y de la liberación de fár-

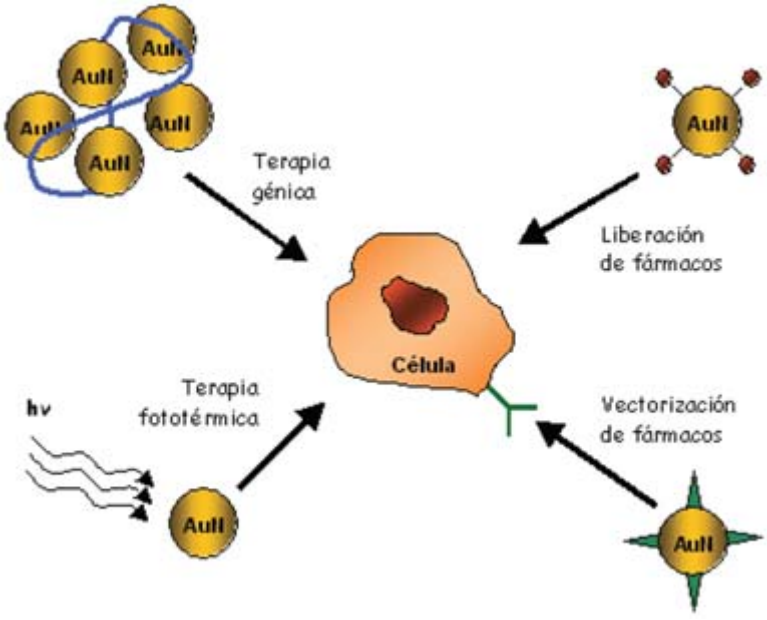


FIGURA 7.3. *Principales aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas de oro.*

maco, las cuales se recogen en el esquema de la Figura 7.3: liberación de fármacos y macromoléculas terapéuticas, terapia génica, terapia fototérmica y vectorización de fármacos en el tratamiento del cáncer.

Liberación de fármacos y macromoléculas terapéuticas

Estudios recientes confirman el gran potencial de las AuNPs en la elaboración de nanotransportadores de fármacos y macromoléculas terapéuticas. Las AuNPs también son útiles en la preparación de «sistemas inteligentes» que liberan la molécula terapéutica encapsulada como consecuencia de la activación de un estímulo interno (liberación mediada por un cambio de pH o liberación mediada por glutatión) o externos (liberación desencadenada por una fuente de luz láser).

Un ejemplo de liberación dependiente del pH es la del óxido nítrico (regula múltiples procesos celulares incluyendo la angiogénesis, vasodilatación y respuesta inmune) en condiciones acídicas (pH = 3) a partir de sus nanoconjugados covalentes con AuNPs estabilizadas con poliamina (67, 68). Este mecanismo tie-

ne aplicación en la liberación de fármacos en el interior de los tejidos inflamatorios y tumorales (pH ~ 6.8) o vesículas celulares como endosomas (pH ~ 5.5-6) y lisosomas (pH 4.5-5.0) que presentan un ambiente ligeramente ácido (69, 70).

La liberación mediada por glutatión de fármacos unidos a AuNPs mediante enlaces bisulfito, representa una estrategia alternativa de activación intracelular selectiva de pro-medicamentos. El glutatión, principal componente «tiol» de la célula, es un tripéptido constituido por los aminoácidos glicina, cisteína y ácido glutámico que actúa como antioxidante intracelular (el grupo tiol de la cisteína actúa como reductor). Este mecanismo de liberación guarda relación con la dramática diferencia existente entre la concentración intracelular de glutatión (1-10 mM) y la concentración extracelular de «tioles» (concentración de glutatión y cisteína en plasma: 2 □M y 8 □M, respectivamente) (71-74).

Este mecanismo de liberación ha sido puesto de manifiesto para el Bodipy (colorante modelo de fármaco hidrofóbico) y la enzima beta-galactosidasa. El Bodipy se encuentra unido a AuNPs (tamaño de núcleo: 2 nm) funcionalizadas con ligandos catiónicos de tetra(etilenglicol) y fluorogénicos para facilitar la penetración a través de la membrana celular. Experimentos en cultivos celulares muestran una rápida captación celular de los nanoconjugados y una eficaz liberación intracelular de la carga, mediada por un proceso de intercambio de glutatión en la superficie de la partícula. Este mecanismo queda demostrado por el aumento experimentado por la liberación del colorante cuando se añade glutatión desde el exterior a las células (5). La unión electrostática de β-galactosidasa a AuNPs catiónicas funcionalizadas con trimetil-amonio, da lugar a una completa inhibición del enzima, que puede ser revertida en presencia de las concentraciones intracelulares de glutatión que da lugar a la liberación de la β-galactosidasa. El grado de restauración de la actividad enzimática depende de la longitud de cadena de la monocapa de las AuNPs y de la concentración de glutatión (75). Una limitación de estos sistemas con liberación mediada por el glutatión es la posibilidad de que se pueda producir un intercambio tiol-bisulfito con las cisteínas de superficie de las proteínas existentes en el torrente sanguíneo, lo que podría dar lugar a la formación de conjugados proteína-transportador con biodisponibilidad y perfil farmacocinético no esperados.

Las AuNPs también están siendo investigadas para controlar la liberación de macromoléculas terapéuticas (péptidos, proteínas…), como lo demuestran interesantes trabajos publicados recientemente. Destaca el sistema desarrollado por *Bhumkar y col.* para el transporte transmucosal de insulina, consistente en AuNPs funcionalizadas y estabilizadas con una cubierta del polímero catiónico quitosano (Figura 7.4). Las AuNPs recubiertas de quitosano y con la insulina

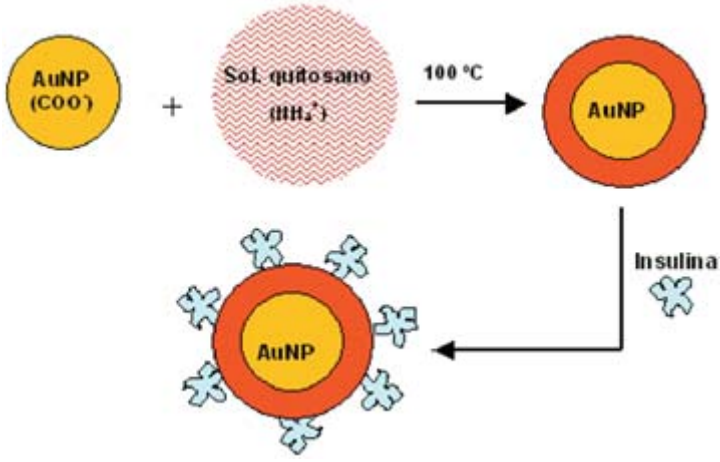


FIGURA 7.4. *Diagrama esquemático que muestra el recubrimiento de una nanopartícula de oro con el polímero quitosano y la asociación posterior de insulina.*

adsorbida en su superficie, cuando son administradas por vía oral y nasal, dan lugar a un efecto hipoglucémico comparable al de la insulina inyectada subcutáneamente y significativamente superior al correspondiente a las soluciones de insulina o de quitosano-insulina administradas por las mismas vías. El descenso máximo de glucosa tras la administración de los nanostransportadores metálicos (60-70%) se alcanza al cabo de 2 h y 3 h, para las vías oral y nasal, respectivamente (76, 77).

El efecto fototérmico de las AuNPs presenta una atractiva oportunidad en el tratamiento fototerapéutico del cáncer, que abordaremos posteriormente, así como en el desarrollo de vehículos de liberación sensibles a estímulos luminosos externos, interesantes para fármacos que se emplean en el tratamiento de procesos patológicos que requieran una liberación del fármaco en respuesta a requerimientos metabólicos. Este es el caso de la insulina y ciertos enzimas, para los que niveles constantes de fármaco podrían provocar efectos adversos. Siguiendo este principio, se han diseñado sistemas microparticulares de liberación conteniendo dextranos marcados con fluoresceína, que incorporan AuNPs en la cubierta. La liberación del FITC-dextrano (Figura 7.5) se produce como respuesta a la exposición del sistema a radiación láser que ocasiona el calentamiento de la AuNPs y la ruptura de la cubierta, con la consiguiente salida del fármaco (78).

Un concepto similar se aplicó a la preparación de un hidrogel termo-sensible que incorpora embebidas AuNPs de oro-sílica; de forma que al ser externamente activado por luz láser, la irradiación es absorbida por las AuNPs y con-

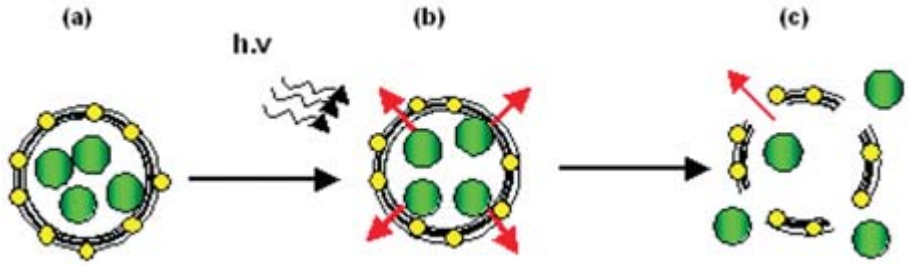


FIGURA 7. 5. *Liberación fototérmica de FITC-dextrano a partir de una microcápsula conteniendo AuNPs en su cubierta, por irradiación de luz: (a) Microcápsula conteniendo FITC-dextrano en el interior y AuNPs en la cubierta; (b) Estimulación fototérmica de la microcápsula y ruptura de la cubierta; (c) Liberación de la macromolécula terapéutica.*

vertida en calor, que conduce al hinchamiento y colapsamiento del gel, facilitando la liberación del fármaco (79). Ejemplos de macromoléculas activas incorporadas a este sistema son insulina y lisozima, que son liberadas a una velocidad dependiente de su peso molecular (80).

Terapia génica

La terapia génica representa una novedosa estrategia para el tratamiento de diversas enfermedades genéticas o adquiridas, resultando particularmente prometedora en el tratamiento de ciertos cánceres (81). El éxito de esta modalidad terapéutica depende de la identificación de un vehículo adecuado para transportar el material genético (DNA plasmídico, RNA de interferencia, oligonucleótidos antisentido…). Para ello, un nano-transportador ideal ha de proporcionar al ácido nucleico una protección eficaz frente a la degradación por las nucleasas, favorecer su internalización al interior de las células y permitir una liberación en forma funcional en el núcleo de las mismas (82). En sus inicios, se recurría a la utilización de vehículos de tipo vírico, los cuales resultaban muy eficaces aunque, sin embargo presentaban importantes inconvenientes relacionados con su citotoxicidad e inmunogenicidad (83) que dificultaban su posible utilización en clínica. Estas limitaciones fueron subsanadas con la introducción de los sistemas de liberación sintéticos no virales, generalmente catiónicos, tipo liposomas, dendrímeros, lipoplexes y polyplexes que presentan, por el contrario, una eficacia menor debido a la barreras a que se enfrentan entre el lugar de administración y su localización en el núcleo de la célula (84).

Las AuNPs, que pueden presentar una elevada relación carga/portador, constituyen una interesante apuesta en terapia génica. Estudios recientes demuestran que las AuNPs mejoran la estabilidad del DNA frente a la degradación enzimática, química y física; reducen su toxicidad y aumentan la eficacia de transfección intracelular (6, 7). Además, es posible ajustar la carga y la hidrofobicidad de las AuNPs al objeto de maximizar la eficacia de transfección y minimizar la toxicidad, retos prioritarios en el desarrollo de sistemas de liberación génica. En este sentido, se sabe que la hidrofobicidad de las nanopartículas mejora la eficacia de captación celular y/o subsiguiente liberación del DNA, y que las nanopartículas anfifílicas constituyen vectores de transfección más eficaces.

Se pueden obtener dos tipos de nanoconjugados entre el material genético y las AuNPs, dependiendo de se trate de una unión de tipo no covalente o covalente.

AuNPs funcionalizadas con grupos de amonio cuaternario fueron asociadas a DNA plasmídico mediante interacciones de tipo electrostático. Los resultados demostraron que el nanoconjugado DNA-AuNP resultantes es capaz de proteger al DNA de la digestión enzimática y facilitar su liberación, constituyendo un eficaz sistema de liberación génica (6, 85, 86).

Las AuNPS fueron funcionalizadas por *Klibanov y col.* con polietilenimina ramificada (PEI, 2 KDa), policatión ampliamente utilizado en terapia génica, a fin de proporcionar vectores híbridos de transfección AuNP-polímero. Comprobaron que la eficacia de transfección celular, en células renales Cos-7, varía con la razón molar PEI:oro, siendo los conjugados doce veces más potentes que el propio polímero; es decir que las AuNPS potencian la capacidad de transfección de la PEI. Al igual que en los estudios anteriores, estos autores observaron que al aumentar la hidrofobicidad del sistema nanotransportador, aumenta la internalización celular y, como consecuencia, la eficacia de transfección (87).

*Wong y col.*diseñaron un interesante sistema de de liberación de DNA mediante anclaje de β-cyclodextrina (CD) en la periferia de las AuNPs modificadas con oligo(etileno diamina) (OEA) y demostraron la capacidad de los nanoconjugados OEA-CD de liberar DNA plasmídico en células de cáncer de mama (MCF-7) (88).

Rotello y col. pusieron de manifiesto el interés de la utilización de nanopartículas fotolábiles que liberan el DNA asociado a la superficie de las mismas mediante un mecanismo fotoquímico. La superficie de estas partículas, que presentan un enlace *o*-nitrobencil éster fotoprocesable y una sal de amonio cuaternario

como grupo final, cambia de catiónica a aniónica baja irradiación UV próxima, que rompe el puente nitrobenzoílo del complejo nanopartícula-DNA, creando un grupo aniónico carboxilato y liberando el DNA, cuya transcripción es restablecida. En cultivos celulares, los complejos nanopartícula-DNA son eficazmente captados por las células, produciéndose la liberación del DNA-FITC en el interior de las mismas, que se localiza principalmente en el núcleo de la célula (7).

Los ácido nucleicos pueden ser fácilmente modificados con tioles (–SH) para ser injertados en las nanopartículas mediante uniones de tipo covalente, dando lugar a nanoconjugados covalentes.

Nagasaki y col. prepararon conjugados siRNA tiolado-AuNPs que recubrieron con copolímero bloque de poli(etilenglicol) y metacrilato de poli(2-(*N*,*N*-dimetil amino) etilo para mejorar su internalización celular. Estos sistemas encuentran utilidad en silenciamiento génico (60).

La PEGilación de las AuNPs transportadoras de DNA, mejora su estabilidad y prolonga su vida media en plasma. Además, la excitación (longitud de onda: 400 nm) de las DNA-AuNPs puede originar la desorpción del DNA de la superficie por rotura de los enlaces oro-sulfuro (89). La estabilidad de los bioconjugados de AuNPs en medios de elevada fuerza iónica, mejora al aumentar la fracción molar y cadena de PEG y disminuir el diámetro de partícula. Las AUNPs modificadas con cadenas de PEG de PM 5000 son internalizadas tan eficazmente como los conjugados con cadenas de PM 900. Basándonos en este hallazgo, las AuNPs funcionalizadas con cadenas de PEG de al menos PM 5000 (para evitar la captación por el SRE), que presentan una vida media de circulación de unas pocas horas, podrían resultar las más eficaces para su utilización en, por ejemplo, la terapia del cáncer (90).

Habitualmente, para la elaboración de vehículos de DNA, que han de ser internalizados por la células, se recurre a la utilización de materiales policatiónicos. Sin embargo, la demostración en 2006 de la internalización celular de nanopartículas modificadas con oligonucleótidos (DNA-NPs) que exhiben una superficie muy negativa (91) supone un «giro drástico en el planteamiento». En efecto, estas nanopartículas negativas son estables frente a la degradación enzimática y eficazmente captadas por las células por un proceso de endocitosis que es iniciado por la adsorción de numerosas proteínas séricas en la superficie de las partículas, como lo demuestra el hecho de que el DNA antisentido asociado a la nanopartículas es capaz de controlar la expresión proteica (92).

Terapia del cáncer

Los tratamientos de quimioterapia tradicionales empleados en la terapia del cáncer presentan importantes limitaciones relativas a la reducida especificidad de los agentes quimioterapéuticos por las células tumorales, la corta vida media de los fármacos debido al rápido aclaramiento *in vivo* y la resistencia a muchos fármacos ejercida por las células tumorales. En consecuencia, es objetivo prioritario la identificación un sistema nanotransportador que permita orientar selectivamente (»vectorizar») y, en principio, liberar de manera eficaz la dosis adecuada del fármaco citotóxico en el tumor o células cancerígenas. Esto permitirá mejorar la eficacia y reducir la dosis de fármaco administrado así como los efectos secundarios consecuencia de una distribución aleatoria del fármaco en el organismo.

La vectorización pasiva consiste en la localización del vehículo o vector conteniendo el fármaco en el lecho capilar del tejido tumoral debido a un fenómeno de extravasación a través de los poros de los vasos sanguíneos. Los nanosistemas de 5-10 nm facilitan los efectos de permeación y retención y la PEGilación de las AuNPs (mediante conjugación por PEG-tiolado) permite prolongar el tiempo de permanencia de las nanopartículas en plasma y, en definitiva, mejorar su vectorización pasiva (16, 34, 61).

La vectorización activa conlleva el direccionamiento del fármaco a las células específicas diana, de manera que se modifica la distribución normal del mismo en el organismo, lo que hasta hace poco se consideraba impensable. Este tipo de vehiculización puede conseguirse conjugando al fármaco o nanotransportador una molécula (anticuerpo específico, lectina, proteína, hormona, ligando de bajo PM) capaz de reconocer específicamente y unirse a su diana terapéutica. Ambos tipos de mecanismos, vectorización pasiva y activa, se combinan en un nanostransportador ideal (93-95).

El desarrollo de un nanosistema terapéutico basado en AuNPs, que pueda ser dirigido al lugar adecuado y activado desde el exterior por una fuente luminosa apropiada (rayos láser), ofrece incuestionables ventajas en el tratamiento del cáncer por dos posibles mecanismos: (a) efecto hipertérmico localizado de las AuNPs y; (b) liberación de un posible fármaco antitumoral asociado a las AuNPs, como consecuencia de la incidencia de luz láser. Las AuNPs pueden ser funcionalizadas, como acabamos de comentar, con anticuerpos (biomarcadores moleculares específicos sobreexpresados en la superficie de las células cancerígenas) que se unan específicamente a las células tumorales. La irradiación externa de las células tumorales selectivamente marcadas con las AuNPs con un

láser de frecuencia adecuada al máximo de absorción de las AuNPs (10-50 nm) resulta en un calentamiento selectivo (40-80 ºC) que da lugar a un daño celular irreversible y a la desorganización de los componentes tisulares, a unas potencias láser muy inferiores a las requeridas para destruir las células sanas (fototerapia o tratamiento de hipertermia del cáncer) (10-12, 14, 16, 17, 96, 97).

La gran mayoría de los estudios de vectorización activa con AuNPs y, más específicamente, de hipertermia dirigida, se basan en la utilización de EGFR (receptores del factor humano de crecimiento epidérmico) o HER2 (receptores de herceptina), obviamente debido a la facilidad de disponer de anticuerpos monoclonales (aprobados por la FDA para la terapia del cáncer) que reconocen estas dos proteínas Así se comprobó que la utilización de AuNPs (diámetro del núcleo: 30 nm) estabilizadas con citrato y recubiertas con anti-EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) a fin de dirigirlas de manera específica a las células tumorales HSC3 (células de carcinoma humano oral escamoso) multiplicaba por 20 la eficacia de la terapia fototérmica. La irradiación láser de las células tumorales marcadas con conjugados (nanocilindros) AuNPs-anti-EGFR daba lugar a una destrucción selectiva de las células cancerígenas (17).

AuNPs (*nanocilindros*) fueron funcionalizadas covalentemente con herceptina (trastuzumab; anticuerpo monoclonal que permite el reconocimiento molecular de cáncer de mama que sobre-expresa antígenos muy específicos asociados al tumor) y PEG (protege a las nanopartículas frente al SER). La estabilidad y funcionalidad de las partículas (Her-PEG-AuNPs) fabricadas, fue demostrada *in vitro* en presencia de sangre e *in vivo* en un modelo de cáncer de mama desarrollado en ratón desnudo, comprobándose que las Her-PEG-AuNPs se acumulan *in vivo* en el tumor (62).

Se han propuesto AuNPs-PEGiladas para transportar TNF-α (factor de necrosis tumoral) (8, 93, 98), proteína que tiene una doble función (ligando de vectorización y acción antitumoral) y se emplea en el tratamiento de los tumores carcinoma de colon. La aplicación clínica de esta citoquina, con una excelente eficacia anticancerígena, se encuentra limitada por la elevada toxicidad sistémica. La adsorción de TNF-α, a la superficie de AuNPs-PEGiladas permite maximizar su eficacia antitumoral y minimizar su toxicidad sistémica. *Paciotti y col.* comprobaron que cuando las TNF-AuNPs-PEGiladas son inyectadas intravenosamente a ratones, se acumulan fundamentalmente en las células de carcinoma de colon (MC-38) en detrimento del hígado y bazo (pobre acumulación en el SRE) u otros órganos sanos. La combinación de los principios de hipertermia local y liberación de fármaco en un mismo sistema se traduce en un aumento de la eficacia terapéutica con respecto a cada uno de los tratamientos por

separado: se retrasa significativamente el crecimiento tumoral, se reduce la perfusión sanguínea del tumor y disminuye la supervivencia de las células tumorales. Como consecuencia de estos interesantísimos resultados, en la actualidad se esté llevando a cabo un estudio clínico en fase I de este conjugado (CYT-6091) con la finalidad de evaluar su perfil de toxicidad, farmacocinética y eficacia clínica (2). Por otra parte, se comprobó que se produce una mejora adicional de la terapia tumoral cuando el fármaco anticancerígeno paclitaxel sec incorpora a las TNF-AuNPs-PEGiladas (9).

El anclaje del ligando Galactosa-PEG-tiol en las AuNPs (obtención de Gal-PEG-AuNPs) facilita la vectorización activa a los hepatocitos hepáticos, particularmente cuando se utilizan partículas de 50 nm (99).

El ácido fólico y el metotrexato son dos moléculas específicamente reconocidas por los receptores de folato que se encuentran sobreexpresados en las superficies de muchas células tumorales, presentando además el metotrexato, actividad antitumoral. Se han preparado conjugados de AuNPs con estos compuestos con fines de vectorización: *Andres y col.* conjugan ácido fólico a AuNPs (10 nm) mediante un espaciador PEG y demuestran la captación selectiva e internalización de las nanopartículas de ácido fólico-AuNPs por células KB receptor de folato-positivas, mientras que la captación por las células WI que no sobre-expresan el receptor de folato, es escasa (100). *Chen y col.* investigan in vitro e in vivo la actividad citotóxica/antitumoral de conjugados de metotrexato-AuNPs, comprobando que la administración del conjugado suprime el crecimiento tumoral en un modelo de carcinoma pulmonar de *Lewis* en ratón, mientras que una dosis similar de metotrexato no presenta actividad (101).

En ocasiones no es suficiente con que el nanotransportador se una a la superficie de la célula diana, sino que ha de ser capaz de atravesar la membrana e internalizarse en la misma (hipertermia y/o liberación intracelular del fármaco vectorizado) e incluso, en algunos casos (terapia génica) localizarse en el núcleo. Con este fin se han ensayados diversas estrategias dirigidas a optimizar el tamaño y las propiedades superficiales de los nanotransportadores. *Chithrani y col.* constatan que AuNPs de oro esféricas de 50 nm de diámetro, son internalizadas por las células de mamíferos a una velocidad más rápida y elevada que partículas con otros tamaños; y que las nanopartículas recubiertas de transferrina se internalizan en las células posiblemente vía un camino de endocitosis mediado por una proteína específica (46).

AuNPs con forma *cilíndrica,* recubiertas con bromuro de cetiltrimetilamonio (surfactante catiónico micelar utilizado en la síntesis de las AuNPs) son

rápidamente internalizadas por células KB vía un mecanismo de captación no específico, migrando hacia el núcleo a una velocidad de difusión cuadrática. Esta captación no específica disminuye (aumenta la acumulación de las nanopartículas en la superficie de la célula) cuando el surfactante catiónico es removido de AuNPs funcionalizadas con folato. En cualquier caso, ambos tipos de AuNPs confieren a las células tumorales una elevada susceptibilidad fototérmica (102).

Las AuNPs han sido «decoradas» con péptidos (péptido CALNN, péptido TAT) (63, 103) que favorecen su transporte a través de la membrana celular y la vectorización de componentes intracelulares (translocación en el núcleo). Los complejos CALNN-AuNPs exhiben propiedades de reconocimiento específico hacia el núcleo y el retículo endoplásmico, pudiendo modularse la distribución hacia uno u otro en función de la concentración de péptido y el tamaño de partícula (63). El péptido TAT (indicador de localización nuclear) permite a las TAT-AuNPs atravesar la membrana celular (células humanas de fibroblasto) y localizarse en el núcleo (103).

Sin lugar a dudas una de las aplicaciones más prometedoras de las AuNPs es su utilización como plataforma que integra en el mismo sistema las dos funciones imprescindibles para el correcto tratamiento del cáncer: diagnóstico y subsiguiente terapia (62). Las AuNPs pueden ser detectadas en muestras biológicas y tejidos utilizando una gran variedad de métodos: microscopía electrónica, de campo oscuro, láser de barrido, tomografía óptica, espectroscopía Raman, imagen de Raxos X, etc. (62).

Este principio de dualidad es utilizado por *Loo y col.* al diseñar AuNPs (con forma de *nanocubierta*) «inmunovectorizadas» con doble función: permitir el diagnóstico del cáncer por imagen óptica molecular (por dispersar la luz en el infrarrojo próximo), y causar la destrucción selectiva de las células de carcinoma vectorizadas mediante terapia fototérmica (debido a que absorben luz y producen hipertermia). En una prueba experimental de concepto, estos autores emplean esta AuNPs para detectar (mediante microscopía de campo oscuro) y destruir (mediante radiación láser que origina hipertermia y ablación térmica) células de carcinoma de mama que sobre-expresan HER2 (biomarcador de cáncer de mama clínicamente relevante (10).

Siguiendo el mismo principio, *Huang y col.* diseñan nanoconjugados (conteniendo nanocilindros) anti EGFR-AuNPs que, en líneas celulares cancerígenas de epitelio oral, permiten visualizar y diferenciar las células cancerígenas de la sanas para, a continuación, destruirlas fototérmicamente (11-13).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La aplicación de las AuNPs en terapia génica y vectorización activa a células tumorales presenta un gran interés. El éxito de la vectorización de AuNPs a células tumorales *in vivo* requiere un esfuerzo de ingeniería que garantice su: (a) biocompatibilidad, (b) estabilidad *in vivo;* (c) capacidad de circular en sangre durante el tiempo suficiente para alcanzar la célula u órgano diana (protección frente al SER utilizando, por ejemplo, PEG); (d) capacidad de reconocer y unirse a las células tumorales; (d) ocasionalmente, capacidad de atravesar la membrana e internalizarse intracelularmente e incluso localizarse en el núcleo.

Especialmente prometedora es la estrategia que consistente en diseñar una nanoplataforma a base de AuNPs que combine, en la misma, las dos funciones: diagnóstico y terapia del cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Bhattacharya, R. & Mukherjee, P. (2008) Biological properties of «naked» metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivey Reviews*. 60: 1289-1306.

(2) Chen, P.C., Mwakwari, S.C. & Oyelere, A.K. (2008) Gold nanoparticles: Fron manomedicine to nanosensing (Review). *Nanotechnology, Science and Applications*. I: 45-66.

(3) Jain, P.K., Huang, X., El-Sayed, I.H. & El-Sayed, M.A. (2008) Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology and medicine. *Accounts of Chemical Research*. 41 (12): 1578-1586.

(4) Gunnarsdottir, S., Rucki, M. & Elfarr, A.A. (2002) Novel glutathione-dependent thiopurine prodrugs: evidence for enhanced cytotoxicity in tumor cells and for decreased bone marrow toxicity in mice. *J. Pharm. Exp. Ther*. 301: 77-86.

(5) Hong, R., Han, G., Fernández, J.M., Kim, B.J. Forbes, N.S. & Rotello, V.M. (2006) Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J. Am. Chem. Soc*. 128: 1078-1079.

(6) Han, G., Martín, C.T. & Rotello, V.M. (2006a) Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem. Biol. Drug Des*. 67: 78-82.

(7) Han, G., You, C.C., Kim, B.J., Turingan, R.S., Forbes, N.S., Martin, C.T. & Rotello, V.M. (2006b) Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed*. 45: 3165-3169.

(8) Paciotti, G.F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R.E. & Tamarkin, L. (2004) Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv*. 11: 169-183.

(9) Paciotti, G.F., Kingston, D.G.I. & Tamarkin, L. (2006) Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Dev. Res*. 67: 47-54.

(10) Loo, C., Lowery, A., Halas, N.J., West, J. & Drezek, W.R. (2005) Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nanoletters*. 4(4): 709-711.

(11) Huang, X., El-Sayed, I.H., Qian, W. & El-Sayed, M.A. (2006a) Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J. Am. Chem. Soc*. 128: 2115-20.

(12) Huang, X., Jain, P.K. & El-Sayed, I.H. (2006b) Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction ofcancer cells with the use immunotargeted gold nanoparticles. *Photochem. Photobiol*. 82: 412-17.

(13) Huang, X., Jain, P.K. & El-Sayed, I.H. (2007a) Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostic and therapy. *Nanomed*. 2: 681-93.

(14) Huang, X., Quian, W., El-Sayed, I.H & El-Sayed, M.A. (2007b) The potencial use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy. *Laser Surg. Med*. 39: 747-53.

(15) Jain, P.K., Lee, K.S., El-Sayed, I.H. & El-Sayed, M.A. (2006a) Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B*.110: 7238-48.

(16) Jain, P.K., El-Sayed, I.H. & El-Sayed, M.A. (2007) Au nanoparticles target cancer. *Nano Today*. 2 (2): 16.

(17) Cai, W., Gao, T., Hong, H. & Sun J. (2008) Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology (Review). *Nanotechnology, Science and Applications I*: 17-32.

(18) Mahdihassan, S. (1971). Colloidal gold as an alchemical preparation. *Janus*. 58: 112-118.

(19) Higby, G.J. (1982) Gold in medicine: a review of its use in the West before 1900. *Gold Bull*. 15: 130-140.

(20) Daniel, M.C. & Astruc, D. (2004) Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev*. 104: 293-346.

(21) Felson, D.T., Anderson, J.J. & Meenan, R.F. (1990) The comparative efficacy and toxicity of second-line drugs in rheumatoid arthritis. Results of two metaanalyses. *Arthritis. Rheum.* 33: 1449-1461.

(22) Shaw, I.C. (1999) Gold-based therapeutic agents. *Chem. Rev.* 99: 2589-2600.

(23) Berners-Price, S.J., Norman, R.E. & Sadler, P.J. (1987a) The autoxidation and proton dissociation constants of tertiary diphosphines: relevance to biological activity. *J. Inorg. Biochem.* 31: 197-209.

(24) Berners-Price, S.J., Girard, G.R., Hill, D.T., Sutton, B.M., Jarrett, P.S., Faucette, L.F., Johnson, R.K., Mirabelli, C.K. & Sadler, P.J. (1990) Cytotoxicity and antitumor activity of some tetrahedral bis(diphosphino)gold(I) chelates. *J. Med. Chem.* 33: 1386-1392.

(25) Haiduc, I. & Silvestru, C. (1989) Rhodium, iridium, copper and gold antitumor organometallic compounds (review). *In Vivo.* 3: 285-293.

(26) Berners-Price, S.J. & Sadler, P.J. (1987b) Interaction of the antitumor Au(I) complex [Au(Ph2P(CH2)2PPh2)2]Cl with human blood plasma, red cells, and lipoproteins: 31P and 1H NMR studies. *J. Inorg. Biochem.* 31: 267-281.

(27) Gielen, M. & Tiekink, E.R.T. (2005) Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: The use of metals in medicine. Hoboken N.J. John Wiley and Sons.

(28) Sun, R.W.Y., Ma, D.L., Wong, E.L.M. & Che, C.M. (2007) Some uses of transition metal complexes as anti-cancer and anti-HIV agents. *Dalton Trans.* 43: 4884-92.

(29) Connor, E.E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C.J. & Wyatt, M.D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* 1 (3): 325-327.

(30) Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R.R., & Sastry, M. (2005) Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir.* 21 (23): 10644-10654.

(31) Sadauskas, E., Wallin, H., Stoltenberg, M., Vogel, U., Doering, P., Larsen, A. & Danscher, G. (2007) Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol.* 4: 10.

(32) Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W. & Jahnen-Dechent, W. (2007) Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small.* 3 (11): 1941-194.

(33) Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T. & Rotello, V.M. (2004) Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chem.* 15 (4): 897-900.

(34) Niidome, T., Yamagata, M., Okamoto, Y., Akiyama, Y., Takahashi, H., Kawano, T., Katayama, Y. & Niidome, Y. (2006) PEG-modified gold nanorods with a stealth character for *in vivo* applications. *J. Control. Release*. 114 (3): 343-347.

(35) Turkevich, J., Stevenson, P.C. & Hillier, J. (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, discuss. *Faraday Soc*. 55-57.

(36) Frens, G. (1973) Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions. *Nature Phys. Sci*. 241: 20-22.

(37) Schmid, G. (1992) Large clusters and colloids - metals in the embryonic state. *Chem. Rev*. 92: 1709-1727.

(38) Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D.J. & Whyman, R. (1994) Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a 2-phase liquid-liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*.: 801-802.

(39) Grabar, K.C., Freeman, R.G., Hommer, M.B. & Natan, M.J. (1995) Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Anal. Chem*. 67: 735-743.

(40) Esumi, K., Suzuli, A., Aihara, N., Usui, K. & Torigoe, K. (1998) Preparation of gold colloids with UV irradiation using dendrimers as stabilizer. *Langmuir*. 14 (3): 3157-9.

(41) Shi, X., Ganser, T.R., Sun, K., Balogh, L.P. & Baker, J.R. (2006) Characterization of crystalline dendrimer-stabilized gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 17:1071-8.

(42) Shi, X., Wang, S., Meshinchi, S., Van Antwerp, M. E., Bi, X., Lee, I. & Baker, J.R. (2007a) Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as a platform for cancer-cell targetingand imaging. *Small*. 3: 1245-52.

(43) Shi, X., Wang, S., Sun, H. & Baker, J.R. (2007b) Improved biocompatibility of surface functionalized dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Soft. Matter*. 3: 71-4.

(44) Shi, X., Lee, I. & Baker, J.R. (2008) Acetylation of dendrimer-entrapped gold and silver nanoparticles. *J. Mater.Chem*. 18: 586-93.

(45) Yuan, J.J., Schmid, A. & Armes, S.P. (2006) Facile synthesis of highly biocompatible poly(2-(methacryololoxy)ethyl phosphorylcholine)-coated gold nanoparticles in aqueous Solutions. *Langmuir*. 22: 11022-7.

(46) Chithrani, B.D., Ghazani, A.A. & Chan, W.C.W. (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano. Lett*. 6: 662-668.

(47) Chithrani, B.D. & Chan, W.C.W. (2007) Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano. Lett*. 7: 1542-1550.

(48) Kumar, R., Maitra, A.N., Patanjali, P.K. & Sharma, P. (2005) Hollow gold nanoparticles encapsulating horseradish peroxidise. *Biomaterials*. 26: 6743-53.

(49) Hostetler, M.J., Wingate, J.E., Zhong, C.J., Harris, J.E., Vachet, R.W., Clark, M.R., Londono, J.D., Green, S.J., Stokes, J.J., Wignall, G.D. Glish, G.L., Porter, M.D., Evans, N.D. & Murray, R.W. (1998) Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir*. 14: 17-30.

(50) Gibson, J.D., Khanal, B.P. & Zubarev, E.R (2007) Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc*. 129: 11653-11661.

(51) Shimmin, R.G., Schoch, A.B. & Braun, P.V. (2004) Polymer size and concentration effects on the size of gold nanoparticles capped by polymeric thiols. *Langmuir*. 20: 5613-5620.

(52) Fan, J., Chen, S.W. & Gao, Y. (2003) Coating gold nanoparticles with peptide molecules via a peptide elongation approach. *Colloids Surf., B Biointerfaces.* 28: 199-207.

(53) Otsuka, H., Akiyama, Y., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. (2001) Quantitative and reversible lectin-induced association of gold nanoparticles modified with alpha-lactosyl-omega-mercapto-poly(ethylene glycol). *J. Am. Chem. Soc*. 123: 8226-8230.

(54) Otsuka, H., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. (2003) PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 55: 403-419.

(55) Olivier, J.C., Huertas, R., Lee, H.J., Calon, F. & Pardridge, W.M. (2002) Synthesis of pegylated immunonanoparticles. *Pharm. Res*. 19: 1137-1143.

(56) Ishii, T., Otsuka, H., Kataoka, K. & Nagasaki, Y. (2004) Preparation of functionally PEGylated gold nanoparticles with narrow distribution through autoreduction of auric cation by alpha-biotinyl-PEG-block-[poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate)]. *Langmuir*. 20: 561-564.

(57) Khalil, H., Mahajan, D., Rafailovich, M., Gelfer, M. & Pandya, K. (2004) Synthesis of zerovalent nanophase metal particles stabilized with poly(ethylene glycol). *Langmuir*. 20: 6896-6903.

(58) Tshikhudo, T.R., Wang, Z. & Brust, M. (2004) Biocompatible gold nanoparticles. *Mater. Sci. Technol*. 20: 980-984.

(59) Takae, S., Akiyama, Y., Otsuka, H., Nakamura, T., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. (2005) Ligand density effect on biorecognition by PEGylated gold nanoparticles: regulated interaction of RCA(120) lectin with lactose installed to the distal end of tethered PEG strands on gold surface. *Biomacromolecules*. 6: 818-824.

(60) Oishi, M., Nakaogami, J., Ishii, T. & Nagasaki, Y. (2006) Smart PEGylated gold nanoparticles for the cytoplasmic delivery of siRNA to induce enhanced gene silencing. *Chem. Lett*. 35: 1046-1047.

(61) Yih, T.C. & Al-Fandi, M. (2006) Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J. Cell. Biochem.* 97: 1184-1190.

(62) Eghtedari, M., Liopo, A.V., Copland, J.A., Oraevsky, A.A. & Motamedi, M. (2009) Engineering of Hetero-Functional Gold Nanorods for the in vivo Molecular Targeting of Breast Cancer Cells. *NANOLetters.* 9(1): 287-291.

(63) Sun, L., Liu, D. & Wang, Z. (2008) Functional Gold Nanoparticle-Peptide Complexes as Cell-Targeting Agents. *Langmuir.* 24 (18): 10293-10297.

(64) Zharov, V.P., Mercer, K.E., Galitovskaya, E.N. & Smeltzer, M.S. (2006) Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. *Biophys. J.* 90: 619-627.

(65) Mulvaney, P. (1996) Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir.* 12: 788-798.

(66) Burda, C., Chen, X., Narayanan, R. & El-Sayed, M.A.(2005) Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Rev.* 105: 1025-1102.

(67) Mocellin, S., Bronte, V. & Nitti, D. (2007) Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med. Res. Rev.* 27: 317-352.

(68) Polizzi, M.A., Stasko, N.A. & Schoenfisch, M.H. (2007) Water-soluble nitric oxide-releasing gold nanoparticles. *Langmuir.* 23: 4938-4943.

(69) Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 663-700.

(70) Engin, K., Leeper, D.B., Cater, J.R., Thistlethwaite, A.J., Tupchong, L. & Mcfarlane, J.D. (1995) Extracellular pH distribution in human tumors. *Int. J. Hypertherm.* 11: 211-216.

(71) Anderson, M.E. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem.-Biol. Interact.* 112: 1-14.

(72) Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 916-921.

(73) Jones, D.P., Carlson, J.L., Samiec, P.S., Sternberg, P., Mody, V.C., Reed, R.L. & Brown, A.S. (1998) Glutathione measurement in human plasma evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. *Clin. Chim. Acta.* 275: 175-184.

(74) Jones, D.P., Carlson, J.L., Mody, V.C., Cai, J.Y., Lynn, M.J. & Sternberg, P. (2000) Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 625-635.

(75) Verma, A., Simard, J.M., Worrall, J.W.E. & Rotello, V.M. (2004) Tunable reactivation of nanoparticle-inhibited beta-galactosidase by glutathione at intracellular concentrations. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 13987-13991.

(76) Joshi, H.M., Bhumkar, D.R., Joshi, K., Pokharkar, V & Sastry, M. (2006) Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery. *Langmuir*. 22: 300-305.

(77) Bhumkar, D.R., Joshi, H.M., Sastry, M. & Pokharkar, V.P. (2007) Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. *Pharm. Res*. 24: 1415-1426.

(78) Angelatos, A.S., Radt, B. & Caruso, F. (2005) Light-responsive polyelectrolyte/gold nanoparticle microcapsules. *J. Phys. Chem. B*. 109: 3071-3076.

(79) Sershen, S.R., Westcott, S.L., Halas, N.J. & West, J.L. (2000) Temperature-sensitive polymer-nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res*. 51: 293-8.

(80) Bikram, M., Gobin, A.M., Whitmire, R.E. & West, J. (2007) Temperature-sensitive hydrogels with SiO_2-Au nanoshells for controlled drug delivery. *J. Control. Release*. 123: 219-27.

(81) Miller, A.D. (1992) Human gene-therapy comes of age. *Nature*. 357: 455-460.

(82) Thomas, M. & Klibanov, A.M. (2003a) Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 62: 27-34.

(83) Check, E. (2002) Gene therapy: a tragic setback. *Nature*. 420: 116-118.

(84) Wiethoff, C.M. & Middaugh, C.R. (2003) Barriers to nonviral gene delivery. J. *Pharm. Sci*. 92: 203-217.

(85) McIntosh, C.M., Esposito, E.A., Boal, A.K. Simard, J.M., Martin, C.T. & Rotello, V.M. (2001) Inhibition of DNA transcription using cationic mixed monolayer protected gold clusters. *J. Am. Chem. Soc*. 123: 7626-7629.

(86) Sandhu, K.K., McIntosh, C.M., Simard, J.M., Smith, S.W. & Rotello, V.M. (2002) Gold nanoparticle-mediated transfection of mammalian cells. *Bioconjug. Chem*. 13: 3-6.

(87) Thomas, M. & Klibanov, A.M. (2003b) Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 100: 9138-9143.

(88) Wang, H., Chen, Y., Li, X.Y. & Liu, Y. (2007) Synthesis of oligo(ethylenediamino)-beta-cyclodextrin modified gold nanoparticle as a DNA concentrator. *Mol. Pharm*. 4: 189-198.

(89) Jain, P.K., Qian, W. & El-Sayed, M.A. (2006b) Ultrafast cooling of photoexcited electrons in gold nanoparticle-thiolated DNA conjugates involves the dissociation of the gold-thiol-bond. *J. Am. Chem. Soc*. 128: 2426-33.

(90) Yanlin, L., Shipton, M.K., Ryan, L., Kaufman, E.D., Franzen, S. & Feldheim, D.L. (2007) Synthesis, stability and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly(ethylene glycol) monolayers. *Anal. Chem*.79: 2221-9.

(91) Rosi, N.L., Giljohann, D.A., Thaxton, C.S., Lytton-Jean, A.K.R., Han, M-S. & Mirkin, C.A. (2006) Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science*. 312: 1027-1030.

(92) Giljohann, D.A, Seferos, D.S., Patel, P.C., Millstone, J.E., Rosi, N.L. & Mirkin, C.A. (2007) Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-modified gold nanoparticles. *Nano Lett*. 7: 3818-3821.

(93) Baban, D.F. & Seymour, L.W. (1998) Control of tumour vascular permeability. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 34: 109-119.

(94) Brigger, I., Dubernet, C. & Couvreur, P. (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 54: 631-651.

(95) Brannon-Peppas, L. & Blanchette, J.O. (2004) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliver. Rev*. 56: 1649-1659.

(96) El-Sayed, I.H., Huang, X. & El-Sayed, M.A. (2005) Selective laser photo-thermal therapy of pithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett*. 239: 129-35.

(97) Chen, J., Wang, D., Xi, J., Au, L., Siekkinen, A., Warsen, A., Li, Z.Y., Zhang, H., Xia, Y. & Li, X. (2007a) Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells. *Nano Lett*. 7: 1318-22.

(98) Visaria, R.K., Griffin, R.J., Williams, B.W., Ebbini, E.S., Paciotti, G.F., Song, C.W. & Bischof, J.C. (2006) Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor-α delivery. *Mol. Cancer. Ther*. 5: 1014-20.

(99) Bergen, J.M., Von Recum, H.A., Goodman, T.T.Massey, A.P. & Pun, S.H. (2006) Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. *Macromol. Biosci*. 6: 506-516.

(100) Dixit, V., Van den Bossche, J., Sherman, D.M., Thompson, D.H. & Andres, R.P. (2006) Synthesis and grafting of thioctic acid-PEG-folate conjugates onto Au nanoparticles for selective targeting of folate receptor-positive tumor cells. *Bioconjug. Chem*. 17: 603-609.

(101) Chen, Y.H., Tsai, C.Y., Huang, P.Y., Chang, M.Y., Cheng, P.C., Chou, C.H., Chen, D.H., Wang, C.R., Shiau, A.L. & Wu, C. L. (2007b) Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model. *Mol. Pharm*. 4: 713-722.

(102) Huff, T.B., Tong, L., Zhao, Y., Hansen, M.N., Cheng, J.X. & Wei, A. (2007) Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. *Nanomedicine*. 2 (1): 125-132.

(103) Fuente, J.M. de la & Berry, C.C. (2005) Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconjug. Chem*. 16: 1176-1180.

APLICACIONES FARMACOTERAPÉUTICAS

8. Cáncer

JOSÉ LUIS VILA JATO [1] Y PILAR CALVO [2]

[1] *Académico de la Real Academia Nacional de Farmacia.*

[2] *Pharmamar.*

Toda innovación tecnológica adquiere la máxima relevancia cuando tiene alguna implicación en la Salud. En este sentido uno de los aspectos diferenciadores que ofrece la Nanotecnología es aquel que se refiere a su capacidad disruptiva sobre el concepto de medicina y terapia.

Con la aplicación de las nuevas nanotecnologías esperamos que la medicina sea más proactiva que curativa; que el diagnostico precoz, rápido y no invasivo así como terapias seguras, selectivas y sin efectos secundarios sean lo que caracterice una nueva era en Medicina.

Si estos aspectos son deseables para el diagnóstico y tratamiento de cualquier enfermedad, se convierten en esenciales cuando hablamos de cáncer.

El cáncer sigue siendo una de las enfermedades más devastadoras con más de 10 millones de nuevos casos anualmente. Afortunadamente la mortalidad ha descendido en los últimos años debido a una mejor comprensión de los mecanismos celulares del tumor y avances en los sistemas de diagnostico y tratamiento. Sin embargo dentro de la comunidad científica existe el consenso al considerar que el indudable progreso en el conocimiento biológico del cáncer producido durante los últimos 25 años, no han tenido una repercusión comparable a nivel clínico. Son varias las causas de este desfase entre las que hay que señalar la limitaciones de los sistemas de diagnóstico actuales para suprimir de un diagnóstico precoz así como la dificultad para la administración de las nuevas moléculas activas fruto de estos conocimientos que de forma general deben de alcanzar de selectivamente el lugar de acción para demostrar todo su potencial terapéutico.

Conviene no olvidar que el cáncer no es una única enfermedad sino que engloba más de 100 patologías distintas y diferenciadas. Si bien todas ellas se caracterizan por el crecimiento celular incontrolado muchas de ellas presentan la habilidad de metastatizarse, diseminarse e invadir más allá de sus límites tisulares originales. Si la existencia de un tumor se detecta pronto y antes de su diseminación, éste puede ser eliminado mediante cirugía con un excelente pronóstico para el paciente. Sin embargo una vez metastatizado la cirugía no es suficiente y la evaluación del grado de dispersión del tumor es esencial para la selección y éxito del tratamiento. La pronta detección y localización de células metastáticas resulta crucial para un control adecuado de la enfermedad.

El progreso en las técnicas de diagnóstico gracias a la aplicación de aproximaciones nanotecnologicas conllevará un espectacular avance en la supervivencia del enfermo de cáncer. Actualmente existen una amplia gama de sistemas de diagnóstico por imagen para detectar tumores de alrededor 1 cm conteniendo aproximadamente 1.000 millones de células, pero sería muy conveniente poder llegar a detectar a niveles de tan solo unos cientos de miles para poder abordar terapéuticamente la enfermedad en sus inicios con más garantías de éxito. Por otra parte sería de un gran interés métodos diagnósticos no invasivos que permitan identificar los tumores por su perfil molecular lo que facilitaría la detección de tumores en sus estadios más tempranos.

Otra de las limitaciones actuales en la terapia del cáncer reside en el tiempo requerido para la evaluación de grado de éxito o fracaso de la estrategia terapéutica emprendida. Muy a menudo, médicos y pacientes deben de esperar varios meses para tener evidencias de la eficacia de la terapia y si esta falla, en muchos casos se reduce el grado de éxito de una nueva estrategia terapéutica. El conocer desde el inicio del tratamiento la localización del agente terapéutico, su grado de eficacia a nivel tumoral y el efecto sobre el mismo resulta igualmente necesario para un avance real en el control de la enfermedad.

Estos retos pueden ser abordados más fácilmente desde la aplicación de nanotecnologías para el diseño de sistemas y componentes como nuevos agentes de contraste, nanopalancas, nanofibras, nanoarrays, biochips y biosensores aplicados al diagnóstico *in vitro* e imagen tanto para la detección de mutaciones, identificación de distintos tipos celulares tumorales, identificación de dianas terapeuticas, distinción entre células malignas y normales, identificación de lesiones metastáticas o tumores primarios, evaluación de la localización del gente terapéutico y su nivel de efectividad. La miniturización de los sistemas y componentes de las técnicas diagnósticas permiten ofrecer herramientas de sensibilidad, especificidad y fiabilidad mejoradas. También ofrecen la posibilidad

de realizar medidas de parámetros diferentes en paralelo o de integrar varias etapas distintas del proceso de análisis desde la preparación de la muestra hasta su detección en un simple dispositivo miniaturizado. La disminuida agresividad de las técnicas es otro de los previsibles logros que aportará la nanotecnología al campo del diagnóstico al permitir un análisis más frecuente, rutinario y menos invasivo.

No son pocas las opiniones que se expresan apuntando que la lucha contra el cáncer ha de enfocarse en la prevención y detección precoz. Pero otros muchos opinan que algunas de las patologías tumorales se convertirán en enfermedades crónicas tan pronto como se disponga de tratamientos fiables, efectivos y seguros donde se minimicen los efectos secundarios producidos por las terapias actuales. Este objetivo se conseguirá cuando las moléculas activas sean direccionadas especificamente a las células tumorales, reto asumible desde la aplicación de las nanotecnologías a la liberación de fármacos. Hoy en día se piensa que un sistema terapéutico ideal para el tratamiento del cáncer sería aquel que se dirija selectivamente a las células que están en sus primeros estadios de transformación, hacia el fenotipo canceroso e identifique las células metastáticas en el torrente sanguíneo.

Las innovaciones en las estrategias terapéuticas en cáncer apuntan a tres grandes enfoques debido a la singularidad biologica de las masas tumorales: angiogénesis, vasculatura tumoral y vectorización de agentes citotóxicos y citostaticos.

La angiogénesis, o desarrollo de vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente, no solo es importante en diversos procesos fisiológicos sino también en situaciones patológicas como la progresión tumoral y metástasis. El tumor se desarrolla inicialmente sin neovascularización pero rara vez sobrepasa los 2-3 mm^2 por lo que suelen ser lesiones asintomáticas y clínicamente no dectectables; sus células pueden crecer a la misma velocidad que las variedades vascularizadas pero la proliferación y muerte celular se mantienen en equilibrio. Cuando un grupo de células se desvía hacia un fenotipo angiogénico la masa tumoral se vasculariza y, a partir de éste momento, el tumor se convierte en clínicamente detectable, sintomático y los nuevos vasos proveen al tumor de una via a través de la cual las células tumorales salen del tumor primario y entran en la circulación sanguínea.

La angiogénesis es un complejo proceso en el que intervienen muchos factores de crecimiento y sus correspondientes receptores, citoquinas, proteasas y moléculas de adhesión. Esquemáticamente, y tal como se recoge en la Figura 8.1, comprende las siguientes fases:

1. Liberación, a partir de la masa tumoral de factores angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).
2. Hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos, extravasación de proteínas plasmáticas y desarrollo de un armazón provisional de fibrina.
3. Destrucción proteolítica de la matriz extracelular y brote de capilares nuevos.
4. Desarrollo capilar por proliferación del endotelio y migración hacia el tumor.
5. Formación y estabilización de los nuevos capilares sanguíneos.

La angiogénesis también es imprescindible para la diseminación de un cáncer y desarrollo de metástasis. Las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor sólido determinado, entrar en un vaso sanguíneo, y trasladarse a un sitio distante, donde pueden implantarse y comenzar el crecimiento de un tumor secundario o metástasis. Está demostrado que los nuevos vasos sanguíneos en un tumor sólido son más permeables que la vasculatura normal por lo que permite la infiltración de células tumorales en la vascularización sanguínea.

Las células endoteliales son mucho más estables genéticamente que las células del cáncer, y tienen un periodo de duplicación más largo. La estabilidad genómica junto a su longevidad (comparada con las células tumorales), pueden ser un blanco ideal para las terapias dirigidas contra ellas. Las células endoteliales no escaparán a la terapia, pues no experimentarán mitosis con una tasa tan rápida y no desarrollarán ninguna mutación de resistencia a la droga en la generación siguiente. El resultado final de atacar a las células endoteliales es la extinción de una especie o población de las células (células endoteliales), seguida por el derrumbamiento del ecosistema (el tumor).

Numerosos fármacos diseñados con la estrategia de inhibir de forma selectiva la angiogénesis son terapias de elección en varios tipos tumores, y númerosas nuevas terapias están en evaluación clínica. La nanotecnología contribuye a mejorar la selectividad de las moléculas y a aproximaciones combinadas y de aproximación de terapia génica.

La gran mayoría de los tumores son los llamados tumores sólidos constituidos por una masa compacta celular. El mayor reto, en cuanto a liberación de fármacos, se refiere a la necesidad de que el agente terapéutico atraviese el endotelio vascular, penetre en el espacio intersticial y se una de forma selectiva a la células tumorales.

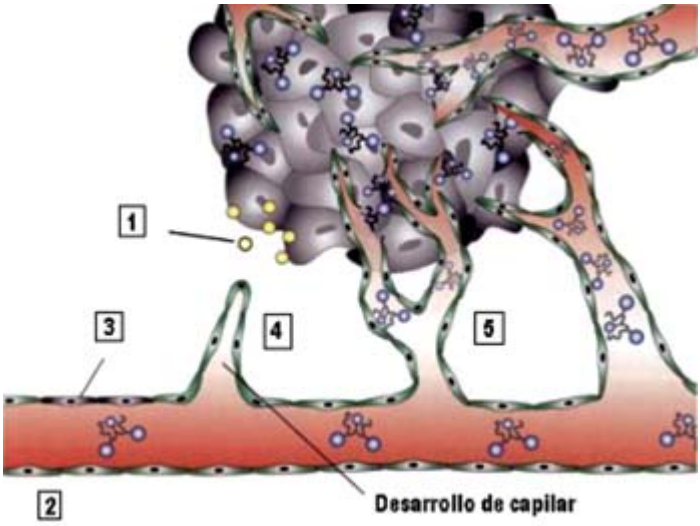


FIGURA 8.1. *Representación esquemática del proceso de angiogénesis (R. Satchi-Fainaro, R. Duncan y C. Barnes: Polymer Therapeutics II).*

En este sentido la particular fisiología del tumor aporta una ventaja a la liberación de fármacos vía sistemas nanoparticulares ya que éstos pueden acumularse en la masa tumoral a través del efecto EPR, descrito en el Capítulo 1, y que sea posible conseguir lo que se denomina vectorización pasiva.

A pesar de los años de trabajo, conocimiento y éxito terapéutico de muchos de estos productos y tecnologías, todavía quedan muchos aspectos que resolver para que el teórico potencial de estos nanosistemas se convierta en realidad.

FORMULACIONES COMERCIALIZADAS

DOXIL® (CAELIX®)

Es una formulación de doxorubicina encapsulada en más del 90% en liposomas estericamente estabilizados con un tamaño 80-90 nm. Los liposomas están constituidos por fosfatidilcolina de soja y colesterol lográndose la estabilización por fijación de las cadenas de metoxipolietilenglicol 2000 al 1,2 diestearoil-sn-glicero 3-fosfoetanolamina (Figura 8.2).

La formulación comercializada se presenta en forma de una dispersión rojiza en viales de 10 ml (20 mg de doxorubicina) o de 30 ml (50 mg de doxorubicina); ade-

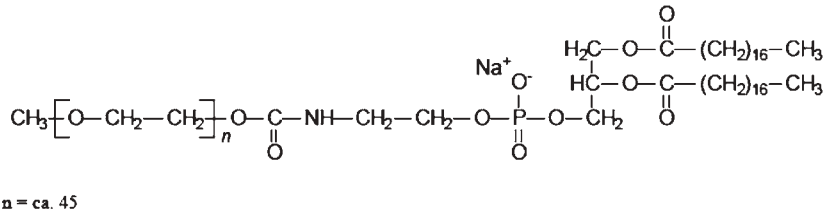


Figura 8.2. *Estructura química de metoxipolietilenglicol 2000-1,2 diestearoil -sn-glicero 3 fosfoetanolamina (sal sódica).*

más contienen sulfato amónico y ácido clorhídrico y/o hidróxido sódico para conseguir un pH de 6,5 y glucosa como isotonizante. Los viales deben conservarse en nevera y la dosis a administrar se debe diluir exclusivamente en suero glucosado (250 ml para dosis inferiores a 90 mg o 500 ml para dosis superiores); esta solución para perfusión es estable durante 24 h en nevera. La perfusión debe iniciarse lentamente (1 mg/min) pudiéndose incrementar la velocidad para realizarla en 1 hora.

Las indicaciones aprobadas para Doxil son:

- Cáncer de ovario: se emplea en los casos en que se manifiesta progresión o recurrencia después del tratamiento con platino. La dosis es de 50 mg/m^2 cada 4 semanas debiéndose mantener el tratamiento mientras el paciente tolere el tratamiento, no se muestren signos de cardiotoxicidad y clínicamente se observe una remisión, considerándose necesarios un mínimo de 4 ciclos ya que en los ensayos clínicos el tiempo medio de respuesta es de 4 meses.
- Sarcoma de Kaposi relacionado con HIV: La dosis es de 20 mg/m^2 administrada cada 3 semanas debiéndose mantener el tratamiento mientras el paciente responda satisfactoriamente y tolere el tratamiento.
- Mieloma múltiple: Tras su aprobación por la FDA para esta indicación Doxil se emplea asociado a Bortezomib el cual se administra i.v. bolus a la dosis de 1,3 mg/m^2 los días 1, 4, 8 y 11 cada 3 semanas y el Doxil a la dosis de 30 mg/m^2.

DEPOCYT®

Es una formulación de citarabina encapsulada en nanopartículas lipídicas multivesiculares que contiene 10 mg/ml de principio activo. En su composición intervienen colesterol, trioleina,dioleilfosfatidilcolina y dipalmi-

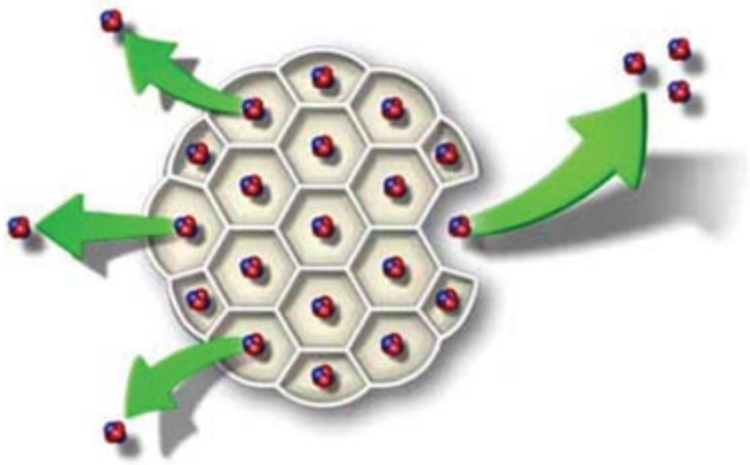


FIGURA 8.3. *Representación del sistema DepoFoam®. Tras su administración tiene lugar una reordenación de las bicapas lipídicas y el fármaco es liberado por un proceso de formación de poros y erosión.*

toilfosfatidilglicerol así como cloruro sódico como isotonizante, siendo el pH entre 5,5 y 8,5. La tecnología utilizada en ésta formulación se conoce con el nombre de DepoFoam® (SkyePharma) y tal como se observa en la Figura 8.3 el sistema está constituido por cientos de cámaras acuosas no concéntricas cada una de las cuales está rodeada por una bicapa lipídica a base de lípidos biocompatibles. La velocidad de liberación del principio activo se controla en función de los componentes lipídicos, excipientes acuosos y modificación de ciertos parámetros durante la producción del sistema. Indicaciones: DepoCyt tiene aprobada la indicación para el tratamiento de la meningitis linfomatosa administrándose dosis de 50 mg de acuerdo con el siguiente esquema posológico:

- Terapia de inducción: se administran 50 mg de DepoCyt por punción lumbar o intraventricular las semanas 1 y 3.
- Terapia de consolidación: Se administran por la misma vía 50 mg de DepoCyt las semanas 5, 7 y 9 y una dosis adicional en la semana 13.
- Mantenimiento: 4 dosis intratecales de 50 mg cada una cada 28 días (semanas 17, 21, 25 y 29).

Si durante el tratamiento se manifiestan signos de toxicidad neurológica se reduce la dosis a 25 mg y si éstos persisten se debe suspender el tratamiento.

DepoCyt se conserva en nevera y debe agitarse suavemente antes de proceder a su administración. Una vez abierto el vial debe utilizarse antes de 4 horas, debiéndose descartar la parte de suspensión no inyectada.

ONCO-TCS (MARQIBO®)

Es una formulación de sulfato de vincristina en liposomas de unos 115 nm cuya bicapa lipídica está constituida por una mezcla esfingomielina y colesterol realizandose la carga de los liposomas por la técnica de gradiante de pH. En oncologia la vincristina se utiliza en diversos procesos tumorales pero frecuentemente la dosis de 2 mg/m^2 debe reducirse debido a neurotoxicidad que frecuentemente se manifiesta como neuropatia periférica. Los estudios clínicos han demostrado que la vincristina en forma de liposomas presenta menor neurotoxicidad lo que permite mantener la dosis de 2 mg/m^2 y con ello su efectividad así como una elevada semivida plasmática (15 h frente a 15 min de la vincrsitina).

La indicación de Onco TCS es el tratamiento del Linfoma no Hodgkin en asociación con otros citostáticos.

ABRAXANE®

Es una suspensión de nanopartículas (con un tamaño medio de 130 nm) de albúmina y paclitaxel que se presenta en un vial que contiene un liofilizado con 100 mg de principio activo y unos 900 mg de albúmina humana. Estas nanopartículas, desarrolladas según la tecnología de la American Biosciences no contienen los disolventes utilizados para disolver el paclitaxel lo cual permite que la infusión dure sobre 30 minutos en lugar del largo tiempo que se utiliza con la formulación convencional; por otra parte se pueden utilizar equipos de perfusión standard en lugar de los equipos especiales que se requieren para administrar el paclitaxel.

El vial conteniendo el liofilizado se conserva a temperatura ambiente y su reconstitución se realiza adicionando 20 ml de suero fisiológico durante un mínimo de un minuto proyectando el líquido sobre las paredes del vial para no formar espuma. Terminada la adición esperar un mínimo de cinco minutos para que tenga lugar una buena humectación de las partículas y agitar suavemente durante al menos dos minutos, evitando la formación de espuma; si ello ocurriese esperar unos 15 minutos. Esta suspensión es estable durante 8 h en ne-

vera y la dosis necesaria de paclitaxel se diluye en suero fisiologico y se administra en una perfusión durante 30 minutos.

La mayor eficacia de Abraxane sobre la clásica formulación de paclitaxel (Taxol®) fue atribuida, en principio, al hecho de que los pacientes podian recibir dosis mas elevadas debido a la ausencia de Cremophor; sin embargo posteriores estudios han puesto de manifiesto que la albúmina interacciona con dos proteínas que la transportan, y con ello el placitaxel, hacia la masa tumoral. La primera proteína, llamada gp60, se localiza en la superficie de las células del endotelio vascular y a consecuencia de esta interacción tienen lugar una serie de procesos bioquímicos que determinan que las nanopartículas se acumulen en el fluido intersticial que rodea el tumor. La segunda proteína, denominada SPARC (secreted protein acidic rich in cysteine) o BM40 u osteonectina, se encuentra en la superficie de muchas células tumorales e interacciona con la albúmina lo que da lugar a una mayor concentración de paclitaxel en estas células. Aunque se trate de un pequeño estudio se ha encontrado que de 14 pacientes, con tumores en cabeza y cuello que expresaron la proteína SPARC, 10 respondieron satisfactoriamente al tratamiento mientras que 4 pacientes, que habian expresado la mencionada proteína, solo 1 respondió al tratamiento convencional con Taxol. Estos datos sugieren que pacientes con expresión positiva SPARC, que son los que presentan peor prognosis, deberan responder favorablemente al tratamiento con Abraxane.

- Indicaciones: La terapia con Abraxane está indicada en el tratamiento del cáncer de mama metastásico tras el fallo de una quimioterapia combinada o recidiva después de seis meses con quimioterapia adyuvante. La dosis de Abraxane es de 250 mg/m^2 cada 3 semanas pero si el paciente experimenta una neutropenia severa (< 500 neutrófilos/mm^2 durante una semana o más) o neuropatía sensorial severa la dosis debe ser de 220 mg/m^2 y si continuan los efectos adversos se debe reducir la dosis a 180 mg/m^2.

MYOCET®

Es una formulación constituida por tres viales: el primero consta de un liofilizado de 50 mg de clorhidrato de doxorubicina y lactosa; el segundo contiene 1,9 ml de liposomas constituidos por fosfatidilcolina de huevo, colesterol, ácido cítrico, hidróxido sódico y agua (conservar en nevera) y el tercero 3 ml de solución de carbonato sódico como tampón.

La preparación de la formulación a inyectar i.v. requiere de las siguientes etapas:

- Disolver el liofilizado de clorhidrato de doxorubicina en 20 ml de suero fisiológico y agitar hasta obtener una solución transparante.
- Calentar un baño de agua hasta una temperatura entre 55-60 ºC.
- Calentar la solución de clorhidrato de doxorubicina durante 10 minutos (no sobrepasar los 15 minutos y mientras se realiza este calentamiento).
- Retirar 1,9 ml del vial conteniendo los liposomas y adicionarlos sobre el vial con la solución tampón, incorporando un filtro de venteo y agitar.
- Adicionar la dispersión de liposomas tamponados sobre la solución de clorhidrato de doxorubicina, colocar un filtro hidrofóbico de venteo y agitar.
- La dispersión obtenida anteriormente se diluye en 40-120 ml de suero fisiológico o glucosado para obtener una concentración de doxorubina de 0,4 a 1,2 mg/ml.
- La solución se administra en perfusión durante 1 h.
- Indicaciones: En combinación con ciclofosfamida está indicado en el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Utlizando una dosis de 600 mg/m^2 de ciclofosfamida, la dosis inicial de Myocet es de 60-75 mg/m^2 cada tres semanas.

DAUNOXOME®

Es una formulación de citrato de daunorubicina (50 mg de duanorubicina base) en liposomas constituidos por diestearoilfosfatidilcolina y colesterol en relación molar 2:1 estando su diámetro medio comprendido entre 35-60 nm. Otros componentes de la formulación son 2,125 mg de glucosa, 84 mg de glicina y 7 mg de cloruro cálcico en un volumen de 25 ml.

- Indicaciones: Daunoxome está indicado unicamente en el tratamiento del sarcoma de Kaposi avanzado relacionado con HIV. El vial debe diluirse con suero glucosado hasta obtener una concentración de 1 mg/ml siendo la dosis recomendada de 40 mg/m^2 la cual se debe administrar durante 1 hora y repetir la administración cada 2 semanas si el contado de granulocitos es superior a $750/mm^3$.

FORMULACIONES EN FASES DE DESARROLLO CLÍNICO

OSI 211

Se trata de una formulación de lurtotecan (0,5 mg/ml) en liposomas unilaminares pegilados conteniendo 10 mmol de cloruro amónico como tampón y 9% de glucosa. La dosis a administrar se diluye hasta 25 ml con suero glucosado y se perfunde durante un tiempo de media hora.

El lurtotecan (Figura 8.4) es un derivado de la camptotecina por lo que su mecanismo de acción es la inhibición de la topoisomerasa I. Los ensayos clínicos realizados en cáncer de ovario establecen que este fármaco se administra a la dosis de 1,5 mg/m^2 en perfusión de media hora durante 5 días y repetición del ciclo cada 3 semanas.

Al igual que sucede con otras formulaciones a base liposomas pegilados, existe una diferencia muy acusada en cuanto al valor del aclaramiento plasmático ya que, en este caso, los valores son de 0,82 L/h/m^2 en la forma liposómica, frente a 21 L/h/m^2 que presenta el lurtotecan. Por ello la formulación en liposomas se presenta como un interesante avance ya que, manteniendo la misma eficacia, esta formulación se administra a la dosis de 1,8 mg/m^2 los días 1, 2 y 3 cada tres semanas. Según el NIH de Estados Unidos los ensayos clínicos realizados con OSI 211 son los siguientes:

- Phase II study to determine the efficacy of OSI 211 (liposomal lurtotecan) given on days 1, 2, 3 every 3 weeks in patients with recurrent small cell lung cancer (Fase II).

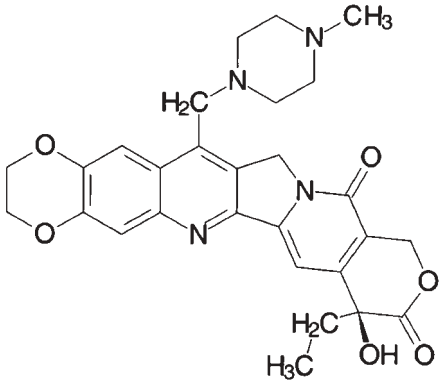


FIGURA 8.4. *Estrutura química de lurtotecan.*

- Liposomal lurtotecan in treating patients with metastatatic or locally recurrent head and neck cancer (Fase II).
- Liposomal lurtotecan plus cisplatin in treating patients with advanced or metastatic solid tumors (Fase II).
- Lurtotecan liposome in treating patients with advanced solid tumors (Fase I).
- Lurtotecan liposome in treating patients with advanced or recurrent ovarian epithelial cancer (Fase II).
- Study of OSI-211 vs topotecan in patients with relapsed epithelial ovarian cancer (Fase II).

S-CKD 602

Se trata de una formulación del análogo de la camptotecina CKD 602 (Belotecan) en liposomas estéricamente estabilizados (Alza Co) compuestos por diestearilfosfatidilcolina y diestearilfosfoetanolamina covalentemente unidos a m-PEG y con un tamaño de unos 100 nm y una eficiencia de encapsulación superior al 85%. Se ha terminado el siguiente ensayo clínico en fase I:

- Safety study of S-CKD 602 in patients with advanced malignancies (ClicalTials.gov).

ANNAMICINA LIPOSOMAL

La annamicina es un citostático derivado de la doxorubicina (Figura 8.5), desarrollado en el M.D. Anderson Cancer Center de Houston que presenta una elevada liposolubilidad y afinidad por los lípidos de las membranas así como mayor actividad en tumores con sobreexpresión de MDR1 que es causa de la aparición de resistencia al tratamiento con otras antraciclinas.

Teniendo en cuenta los resultados clínicos obtenidos con la doxorubicina liposomal se ha desarrollado una formulación de annamicina en liposomas. Esta formulación se presenta en forma de un liofilizado que contiene 20 mg de annamicina (vial de 20 ml) o 50 mg (vial de 100 ml) así como 1750 mg de dimisteroilfofatidilcolina, 750 mg de dimiristoilfosfatidilglicerol y 85 mg de Tween 20 (las cantidades indicadas corresponden a la formulación que contiene 50 mg de principio activo).

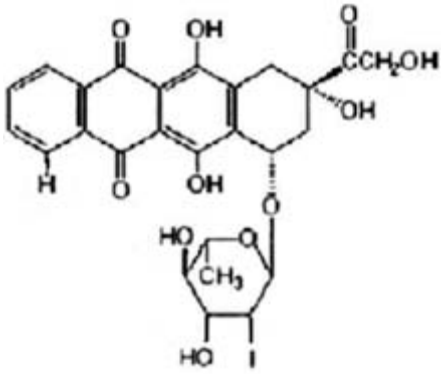


FIGURA 8.5. *Estructura química de la annamicina.*

El liofilizado se reconstituye con 10 o 50 ml de suero fisiológico, dejar reposar dos minutos y agitar suavemente otros dos minutos; esperar a que desaparezca la espuma formada y transferir la dosis necesaria a una bolsa de perfusión.

El NIH recoge los siguientes ensayos clínicos:

- Liposomal annamycin in children and young adults with refractory or relapsed ALL or AML (Fase I).
- Study of liposomal annamycin in patients with refractory or relapsed acute lymphocytic leukemia (Fase I/II).
- Chemotherapy in treating patients with breast cancer (Fase I/II).

Para el tratamiento de ALL o AML la pauta posológica seguida es de un ciclo de 280 mg/m^2 de annamicina liposomal en perfusión de 1 a 2 horas durante 3 días consecutivos, repetición a las 3-4 semanas y de nuevo a las 3-4 semanas, dejando posteriormente transcurrir un periodo de al menos 8 semanas.

SLIT CISPLATIN

Se trata de una formulación de cisplatino en liposomas para su administración por vía pulmonar utilizando la tecnologia SLIT (sustained release lipid inhalation targeting) desarrollada por Transave Inhalation Biotherapeutics en la cual se emplean fosfolípidos análogos a los que constituyen el surfactante pulmonar.

Con esta formulación se pretende resolver los problemas de una administración i.v. de cisplatino derivados de una baja biodistribución a tejido pulmonar (0,1 a 1%), bajo tiempo de permanencia en este tejido y limitación de dosis debida a toxicidad sistémica. Se encuentra en fase I/II el ensayo clínico:

- Inhalation SLIT Cisplatin for the treatment of osteosarcoma metastatic to the lung (ClinicalTrials.gov).

Los resultados obtenidos indican que a dosis de 60 mg/m^2 administrados en 20 sesiones divididas a lo largo de 3 días no muestran toxicidad hematológica, nefrotoxicidad ni neurotoxicidad.

LIPOPLATIN

Es una formulación de cisplatino en liposomas, de un tamaño de 120 nm, formados por el fosfolípido fusógeno dipalmiotoilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina de soja, colesterol y diestearoilfofatidiletanolamina unida a metoxipolietilenglicol 2.000. Se presenta en viales de 50 ml que contienen una concentración de 3 mg/mL de cisplatino que se conservan durante 3 años a una temperatura de 4 ºC. La dosis requerida (del orden de 100 mg/m^2) se diluye en 1 L de suero glucosado que se adminsitra durante 8 horas. Se han publicado los resultados de los ensayos clínicos:

- Phase III trial comparing intensive induction chemoradiotherapy (60 Gy, infusional 5-FU and intermittent cisplatin) followed by maintenance gemcitabine with gemcitabine alone for locally advanced unresectable pancreatic cancer.
- Phase III trial comparing chemoradiotherapy (cisplatin and infusional 5-FU) followed by gemcitabine vs. gemcitabine alone in patients with locally advanced non metastatic pancreatic cancer.
- Phase I trial of lipoplatin and gemcitabine as a second-line chemotherapy in patients with nonsmall cell lung carcinome (Froudarakis y col. (2008): Cancer: 110 (13); 2752- 2760).

SPI-077

Es una formulación de Alza Co en forma de liposomas pegilados de unos 110 nm conteniendo cisplatino. Los liposomas estan constituidos por lecitina de soja hidrogenada, colesterol y mPEG-DSPE. El contenido del vial se diluye con suero fisiológico, que contiene 10 mM de histidina hasta tener 0,2 mg/ml y se

administra en forma de perfusión. Uno de los últimos ensayos clínicos publicados con esta formulación es:

- Phase II study of SPI-77 (sterically stabilised liposomal cisplatin) in advanced non-.small-cell lung cancer (White y col: (2006): Br. J. Cancer: 95 (7): 822-828).

AI-850

Es una formulación de paclitaxel que emplea la tecnología patentada por la firma Acusphere mediante la cual se obtienen nano o micropartículas porosas que permiten solubillizar rápidamente fármacos hidrófobos. En el caso concreto de ésta formulación las micropartículas se obtienen disolviendo paclitaxel, polisorbato 80 y polivinilpirrolidona C15 en etanol; a esta solución se le incorpora una solución acuosa de bicarbonato amónico y manitol como agentes formadores de poros. Finalmente las micropartículas (tamaño medio de 2 mm) se obtienen por atomización. Se ha realizado un ensayo clínico cuya finalidad ha sido establecer la dosis máxima tolerable (hasta 250 mg/m^2) mediante una perfusión de menos de 30 minutos realizada cada 3 semanas. Se han publicado los resultados obtenidos del siguiente ensayo clínico:

- Phase I and Pharmacokinetic Study of AI-850, A Novel Microparticle Hydrophobic Drug Delivery System for Paclitaxel (Mita y col (2007): Clin. Cancer Res.: 13; (11); 3293-3301).

SARCODOXOME

Es una formulación de doxorubicina en liposomas patentada por la firma española GP Pharma en la que el principio activo se encuentra incluido en la pared del liposoma el cual contiene una pequeña cantidad de cromano como agente antioxidante estabilizador. Presenta una reducción de la toxicidad y mejor biodistribución. Ha obtenido la categoría de medicamento huérfano tanto por la EMEA como por la FDA para el sarcoma de tejidos blandos.

GENEXOL-PM

Se trata de una formulación conteniendo paclitaxel incluido en micelas poliméricas de 20 a 50 nm a base de un copolímero de PEG y poli DL láctico. La

formulación con la que se realizan los ensayos clínicos contiene un liofilizado con 30 mg de paclitaxel y 150 mg del copolímero. El liofilizado se disuelve en 5 ml de suero fisiológico y la solución obtenida se diluye con 500 ml de suero glucosado realizandose una perfusión durante 3 horas y se repite el ciclo cada tres semanas. Actualmente se estan realizando ensayos clínicos en Fase II en el que la dosis utilizada es de 300 mg/m^2.

- Paclitaxel in Treating Patients With Unresectable Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer (ClinicalTrials.gov).
- Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a novel cremophor-free, polymeric micelle of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer (Kim y col. (2007): Ann Oncol. 18; (12); 2009-2014).
- Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer (Lee y col. (2008): Breast Cancer Res Treat.: 108 (2); 241-250).

SP1049C (SUPRATEK)

Es una formulación de doxorubicina en micelas constituidas por un copolímero tribloque de Pluronic L61 y Pluronic F127, en una relación peso/peso de 1,8, y cuya carácteríctica fundamental es mostrar actividad sobre células tumorales multirresistentes. Se han publicado los resultados del siguiente ensayo clínico:

- Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicine (SP1049C) in patients with advanced cancer (Danson y col (2004); Br. J. Cancer: 90; (11); 2085-2091).

AROPLATIN

Contiene un nuevo derivado liposoluble de platino (Aroplatin®), análogo al oxaliplatino (Figura 8.6), incluido en liposomas que se encuentra en fase clínica II para el tratamiento de cáncer colorrectal y renal. Aroplatin se dispone en forma de un liofilizado que contiene 100 mg de principio activo y 1,5 g de una mezcla de dimiristoilfosfatdilcolina y dimiristoilfosfatidilglicerol en relación molar 7:3. El liofilizado se disuelve en 50 ml de suero fisiológico acidificado, se agita durante 2 h a temperatura ambiente y finalmente se administra en forma de perfusión i.v. a una velocidad de 4 mg/min. La dosis inicial es de

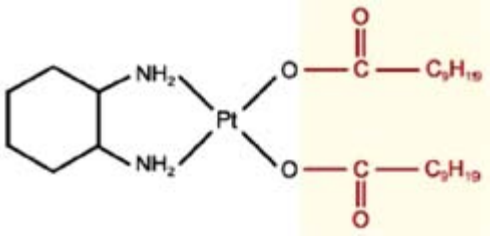


FIGURA 8.6. *cis-bisneodecanoato-trans-R,R- 1,2-diaminocyclohexane platinum(II) (L-NDDP).*

300 mg/m^2 y según la toxicidad mostrada se puede realizar un escalado hasta 450 mg/m^2 o una dismunución hasta 200 mg/m^2 repitiendose el ciclo cada 4 semanas.

Los ensayos clínicos recogidos por el NCI son los siguientes:

- Study of L-NDDP (Aroplatin) in Patients With Advanced Solid Malignancies or B-Cell Lymphoma (Fase I).
- Aroplatin and Gemcitabine in Patients With Advanced Pancreatic Cancer Resistant to Standard Therapies (Fase I/II).
- A Safety and Effectiveness Study of Aroplatin in Patients With Advanced Colorectal Cancer Resistant to Standard Therapies (Fase II).
- Aroplatin and Capecitabine in Patients With Advanced Colorectal Cancer Resistant to Standard Therapies (Fase I/II).
- A Safety and Effectiveness Study of Aroplatin in Patients With Advanced Solid Malignancies (Fase I/II).
- Liposomal-Cisplatin Analogue (L-NDDP) in Treating Patients With Malignant Pleural Mesothelioma (Fase II).

LEP-ETU

Es una formulación de paclitaxel desarrollada por NeoPharma Inc constituida por proliposomas de DOPE, colesterol y bisfosfatidilglicerol (cardiolipina). Cuando se adiciona el disolvente se obtienen liposomas multilamelares, de unos 150 nm, en los que se incluye el principio activo el cual es liberado lentamente. El liofilizado es estable a temperatura ambiente durante al menos 12 meses y previa dilución se administra en forma de perfusión. Se ha demostrado bioequivalencia con la formulación comercializada de placlitaxel pero se ne-

cesita un tiempo menor de perfusión y menor incidencia de efectos secundarios. Los ensayos clínicos recogidos por el NIH son:

- Liposome entrapped paclitaxel easy to use (LEP-ETU) in patients with advanced cancer (Fase I).
- Comparison of liposome entrapped paclitaxel easy to use (LEP-ETU) and Taxol® pharmacokinetics in patients with advanced cancer.

LEM-ETU

Es una formulación análoga a la anterior pero conteniendo mitoxantrona para su administración i.v. durante 45 minutos. Con ello se desea mejorar la seguridad del principio activo para incrementar la dosis y/o aumentar la dosis total administrada. Se ha finalizado el siguiente ensayo clínico:

- Study of liposome encapsulated mitoxantrone (LEM) in patients with advanced cancer (ClinicalTrials.gov).

MTB-0206 (ENDOTAG-1)

Es una formulación desarrollada por MediGene AG constituida por liposomas catiónicos: DOPE y DOTAP conteniendo paclitaxel como principio activo. Debido a que éstos lípidos catiónicos presentan una selectividad hacia las células epiteliales (con carga negativa) de los vasos sanguíneos EndoTAG-1 en donde se acumulan y liberan el cistostático; por ello esta formulación se considera como antiangiogénica y el primer ensayo clínico se ha realizado en pacientes con cáncer pancreático en los que los taxanos son ineficaces pero al incluir el docetaxel entonces se produce una reducción del tumor por destrucción de los vasos producidos en la angiogénesis. Los resultados del ensayo clínico en fase II han sido presentados al Congreso de la European Society for Medical Oncology de 2008:

- Löhr M. Y col: 12-month survival of a phase II trial: first line treatment of inoperable pancreatic adenocarcinoma with cationic lipid complexed paclitaxel nanoparticles (EndoTAG-1) plus gemcitabine compared with gemcitabine monotherapy.

También se está realizando un ensayo clínico en fase II en pacientes con cáncer de mama hormonorresistente cuyos resultados se daran a conocer en 2009.

NK 911

Constituye otra formulación de doxorubicina en micelas de un tamaño medio de 40 nm que se obtienen a partir de un conjugado de doxorubicina y un copolímero constituido por un Pluronic de 5000 D y un poliaspártico (30 unidades). Se están desarrollando ensayos clínicos en cáncer de páncreas.

- Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle- encapsulated doxorubicin (Matsumura Y. Y col: (2004): Brit. J. Cancer: 91; 10: 1775-1781).

NK 012

Esta formulación contiene un derivado de la camptotecina (SN-38) que se une a un copolímero constituido por PEG y poliglutámico modificado obteniéndose, a partir del conjugado, micelas poliméricas de 20 nm tal como se recoge en la Figura 8.7.

Las posibles indicaciones de esta formulación se orientan hacia tumores hipervascularizados como son carcinomas renales, meduloblastomas y carcinomas hepatocelulares. Actualmente está en desarrollo una Fase I bajo el título:

- Study of NK012 in patients with refractory solid tumors (ClinicalTrials.gov).

NC-6004

Es una formulación de micelas de unos 30 nm constituidas por un polímero bloque de poliaminoácidos -PEG conteniendo cis platino y que se encuentra en Fase I de investigación clínica habiéndose presentadose presentado los resultados en Asco 2008:

- Pharmacokinetics of NC-6004, a novel micellar formulation of cisplatin, in a Phase I trial.

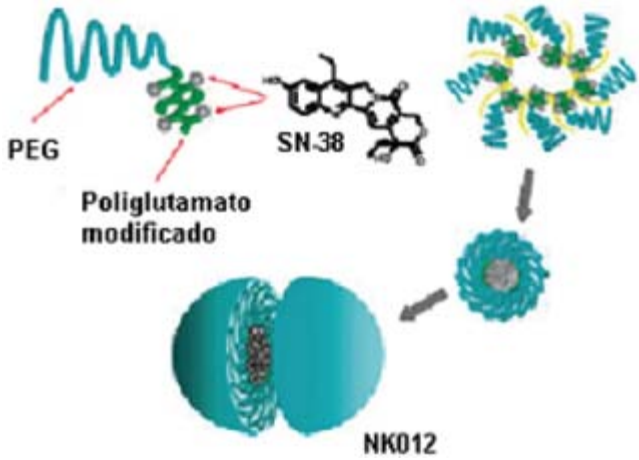


Figura 8.7. *Esquema de la preparación de las micelas NK012.*

AP-5346

Esta formulación contiene paclitaxel incluido en micelas formadas por un copolímero de poliaminoácidos-PEG encontrándose en Fase I de desarrollo clínico.

- AP5346 or oxaliplatin in treating patients with metastatic and/or unresectable recurrent head and neck cancer (ClinicalTrials.gov).

ATRA IV

Es una formulación de tretinoina encapsulada en liposomas para su administración por vía i.v. que posee la designación de medicamento huérfano por la FDA para el linfoma no Hodgkin de células T y leucemia aguda y crónica. Aunque la forma oral de tretinoina (Vesanoid®) ha demostrado su efectividad frente a diversos tipos de cáncer sin embargo la duración de su eficacia es transitoria debida a un descenso de los niveles plasmáticos. Los ensayos clínicos recogidos por el NCI son:

- Tretinoin Plus Interferon Alfa in Treating Patients With Metastatic Kidney Cancer (Fase II).
- Liposomal Tretinoin in Treating Patients With Recurrent or Refractory Hodgkin's Disease (Fase II).

En fase preclínica se encuentran un elevado número de formulaciones constituidas por diversos nanosistemas como liposomas, micelas, nanopartículas, dendrímeros, nanopartículas metálicas, etc. conteniendo una amplia variedad de agentes citostáticos.

VECTORIZACION ACTIVA

Con el nombre de vectorización se conoce la liberación de un principio activo en su diana terapéutica. Hasta el momento, en los ejemplos expuestos, la acumulación y por tanto la vectorización del agente quimioterápico en el tejido tumoral, se hacía basándose en la larga permanencia de la molécula en el torrente circulatorio, en la mayor permeabilidad que presentan los vasos sanguíneos tumorales y el menor drenaje linfático del tumor. En los últimos años la Nanotecnología Farmacéutica ha dirigido sus esfuerzos al diseño y preparación de una tercera generación de nanosistemas que permitan una orientación activa que, en el caso del cáncer, sería una biodistribución preferente hacia las células tumorales basándose en los procesos de reconocimiento celular de receptores sobreexpresados en células tumorales o endotelios de vasos sanguíneos.

Para conseguir una mejor vectorización hacia células tumorales tanto de liposomas como de otros nanovehículos se pueden fijar ligandos específicos. En principio estos ligandos específicos eran coinmovilizados con un polímero que sirviese como estabilizador estérico (Figura 8.8a) pero pronto se pudo comprobar que las cadenas del polímero estabilizador podían interferir la interacción entre el vector y su receptor específico. Por ello se han desarrollado otros tipos de nanosistemas que poseen el vector situado en la parte exterior del sistema y fijado en la porción terminal de las cadenas de PEG de tal forma que los ligandos se encuentran en el exterior de la densa capa polimérica de PEG por lo que no existen impedimentos estéricos para su unión con sus receptores específicos (Figura 8.8b).

Bajo esta idea se han fijado potenciales ligandos a cadenas poliméricas unidas a liposomas. Podemos decir que hoy día la vectorización de nanosistemas se realiza fundamentalmente a través de las cadenas de PEG dada la versatilidad que ofrecen para que se puedan fijar covalentemente un gran número de moléculas como proteínas, péptidos, anticuerpos, aptámeros o sencillas moléculas (Figura 8.9).

En el momento actual la vectorización activa se puede lograr fijando al nanosistema moléculas sencillas como el ácido fólico ya que el receptor folato se

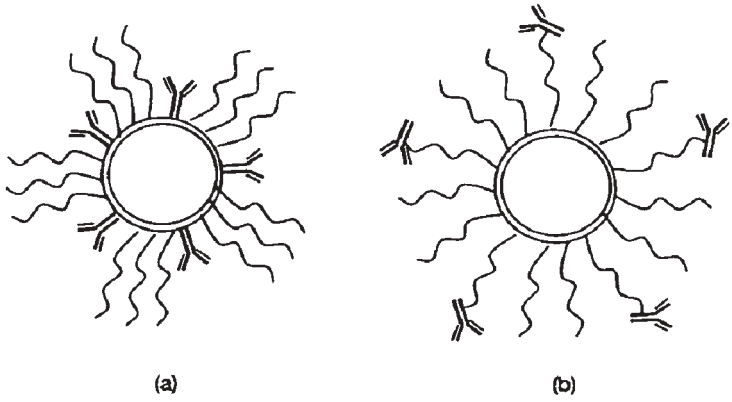


Figura 8.8. *Dos maneras de fijar ligandos específicos a nanosistemas: (a) Coinmovilización del ligando entre las cadenas del polímero estabilizador. (b) Fijación del ligando a la terminal de las cadenas poliméricas estabilizadoras.*

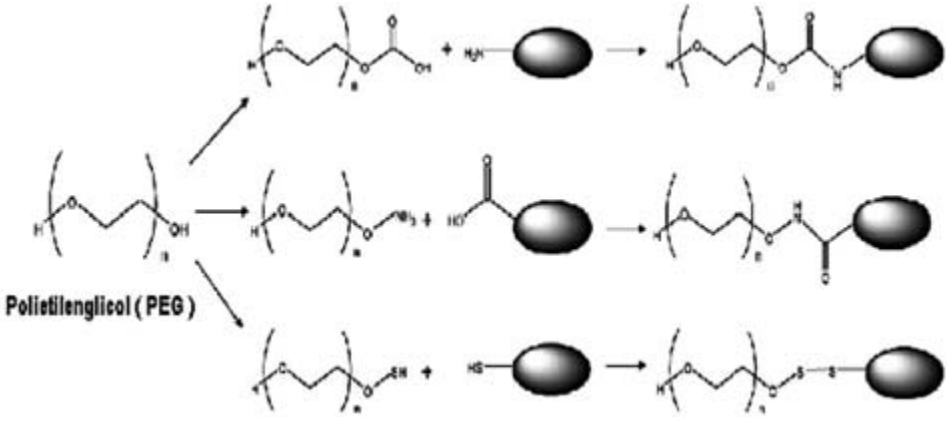


Figura 8.9. *Esquema de la unión covalente de diferentes ligandos a cadenas de PEG.*

encuentra sobreexpresado en múltiples células tumorales como por ejemplo en el cáncer ovárico. Bajo esta idea se han obtenido liposomas que llevan ácido fólico fijado a las cadenas de PEG; igualmente se han preparado micelas poliméricas de poliaspártico a cuya cadena se une ácido fólico y cadenas de PEG sobre las que se fija adriamicina.

En el caso de nanopartículas de polialquilcianoacrilato con cadenas de PEG sobre las que se fija ácido fólico ha sido posible demostrar que tienen una afi-

nidad 10 veces mayor por el receptor folato que el propio ácido fólico. Igualmente nanopartículas de PEG-poliepsiloncaprolactona conteniendo paclitaxel y a las que se fija ácido fólico han demostrado un notable incremento de su citotoxicidad. Finalmente nanopartículas de magnetita a las que se fija ácido fólico (con o sin espaciador de PEG) presentan una acumulación en células tumorales haciendo que estas nanopartículas puedan usarse con fines diagnósticos (como agentes de imagen en RMN) y con fines terapéuticos (destrucción de las células tumorales por hipertermia).

Más recientemente se ha visto que el péptido cíclico RGD es capaz de reconocer el receptor $\alpha v\beta 3$ integrina que se encuentra sobreexpresado en la neovascularización que se origina cuando el tumor tiene un tamaño del orden de 1 mm^2. El descubrimiento de este hecho tiene una gran importancia y constituye actualmente una de las líneas más importantes en la investigación del cáncer ya que se ha visto que la eliminación de una célula del endotelio de los vasos sanguíneos originados en la neovascularización puede inhibir el desarrollo de cien células tumorales. El péptido RGD se ha podido fijar a las cadenas de polietilenglicol de liposomas conteniendo 5 fluoruracilo o doxorubicina encontrándose una actividad superior en líneas celulares C26 de cáncer de colon.

La utilización de moléculas sencillas como el fólico o el péptido RGD como orientadoras de sistemas nanoparticulares hacia dianas del cáncer constituye una interesantísima aportación si bien se han reconocido recientemente ciertas limitaciones como por ejemplo que el folato se encuentra en la dieta alimenticia y los niveles plasmáticos así obtenidos pueden competir con el del nanosistema que lo incorpora.

Moléculas de mayor complejidad también pueden ser fijadas a nanosistemas con la finalidad de orientarlas hacia células tumorales o células endoteliales de los vasos sanguíneos desarrollados en el proceso de angiogénesis. Entre estas moléculas podemos mencionar la glicoproteína transferrina la cual se puede fijar a liposomas y favorecer el paso a través de la membrana de las células tumorales con lo que se consigue un mayor efecto antitumoral de fármacos como la doxorubicina.

Diversos anticuerpos monoclonales han sido fijados a liposomas (inmunoliposomas) y otros nanovehículos con objeto de mejorar su vectorización hacia células tumorales. Aunque estos anticuerpos muestran resultados esperanzadores sin embargo su eficacia puede verse limitada por las barreras biológicas presentes antes de alcanzar las células tumorales, o las condiciones existentes en la diana terapéutica. Diversas investigaciones recientes se orientan hacia la utili-

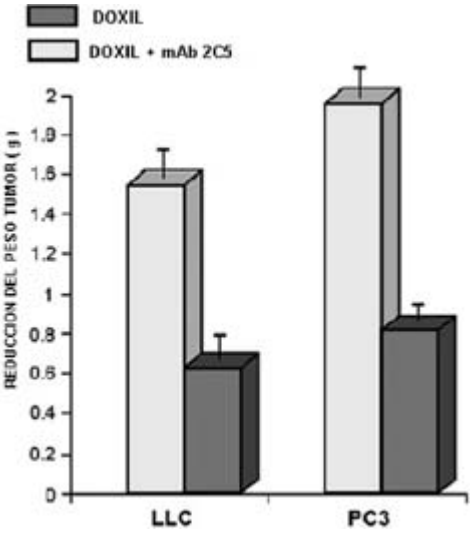


Figura 8.10. *Actividad antitumoral en ratones de Doxil y Doxil+ mAb 2C5 en LLC (carcinoma de pulmón de Lewis) y PC3 (línea de carcinoma de próstata).*

zación de estos anticuerpos en forma de inmunoconjugados con antitumorales como metotrexato, doxorubicina; inmunotoxinas o radioinmunoconjugados con itrio 90, yodo 131 o bismuto 213.

Una forma de fijar anticuerpos a nanosistemas, conteniendo en su superficie cadenas de PEG, consiste en unir biotina a estas cadenas; por otra parte el anticuerpo forma un conjugado con estreptavidina y finalmente se produce la interacción entre biotina-estreptavidina. Cada molécula de estreptavidina tiene cuatro puntos de unión por lo que se deben bloquear con biotina los puntos de unión libres.

Un ejemplo de la utilización de anticuerpos monoclonales fijados a nanovehículos es la fijación de epitopos CD19 a liposomas pegilados con lo que consigue un notable incremento de la eficacia terapéutica sobre células de linfoma B; la fijación de fragmentos de anticuerpo Fab'a liposomas de doxorrubicina estericamente estabilizados muestran un incremento de la actividad frente a los liposomas no vectorizados en aquellos tumores que presentan una sobreexpresión del receptor HER2 o la fijación del anticuerpo CC52 a liposomas los cuales muestran una acumulación específica en modelos de adenocarcinoma de colon en ratas. Igualmente la fijación del anticuerpo monoclonal 2C5 (mAb 2C5) a liposomas de Doxil® (liposomas estericamente estabilizados de doxirrubicina) incrementa la actividad citotóxica tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 8.10).

El primer ensayo clínico Fase I con liposomas conjugados con anticuerpos fue realizado en 2004. Liposomas estericamente estabilizados con PEG, conteniendo doxorubicina, se administraron a 23 pacientes con cáncer de estómago recurrente o metastásico en forma de una perfusión de 1 h cada tres semanas. La duración del tratamiento estaba comprendido entre 48 y 135 días y el vector utilizado fue un fragmento F (ab´) 2 de un anticuerpo monoclonal cáncer-reactivo humanizado (GAH).

- Matsumura Y. y col: Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG inmunoliposomes, in patients with metastatic stomach cancer (2004), Ann Oncol.: 15 (3); 517-525.

Las tecnologías basadas en la vectorización con anticuerpos monoclonales presentan varias desventajas entre las cuales, tal vez la más importante, es que debido al elevado peso molecular (del orden de los 100 kDa) su bioconjugación con liposomas o nanopartículas produce un incremento en su tamaño lo que se traduce en unas características farmacocinéticas y de penetración a tejidos menos favorables. Otras desventajas se derivan de las reacciones de inmunogeneidad o hipersensibilidad siempre presentes aun recurriendo a anticuerpos quimericos o totalmente humanizados.

Los aptámeros constituyen una nueva clase de vectores que pueden utilizarse de manera similar a los anticuerpos pero con un peso molecular mas reducido (del orden de 20 kDa), no son inmunogénicos, son relativamente estables y capaces de ser producidos a escala industrial. Aunque por su peso molecular tienen una elevada excreción renal es posible mejorar por pegilación sus características de excreción y pueden ser estabilizados frente a las nucleasas presentes en el plasma utilizando aptámeros que tienen diversos substituyentes en el núcleo de la ribosa. El primer aptámero aprobado para su uso en terapéutica es el pegaptanib que, uniéndose al factor de crecimiento endotelial vascular, está indicado en el tratamiento de la degeneración macular. Aunque se han aislado diversos aptámeros que se unen a antígenos sobreexpresados en células tumorales, sin embargo poseen una utilidad terapéutica limitada mientras que cada vez es mayor el número de trabajos que se orientan hacia la preparación de bioconjugados de nanopartículas con aptámeros. En general estos nanosistemas están constituidos por nanopartículas, conteniendo agentes antineoplásicos o agentes de contraste, que llevan en su superficie cadenas de PEG a algunas de las cuales se fija el aptámero. Recientemente se ha publicado el primer estudio *in vivo* de nanopartículas de docetaxel y el aptámero A10 RNA que se une al antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) (Figura 8.11).

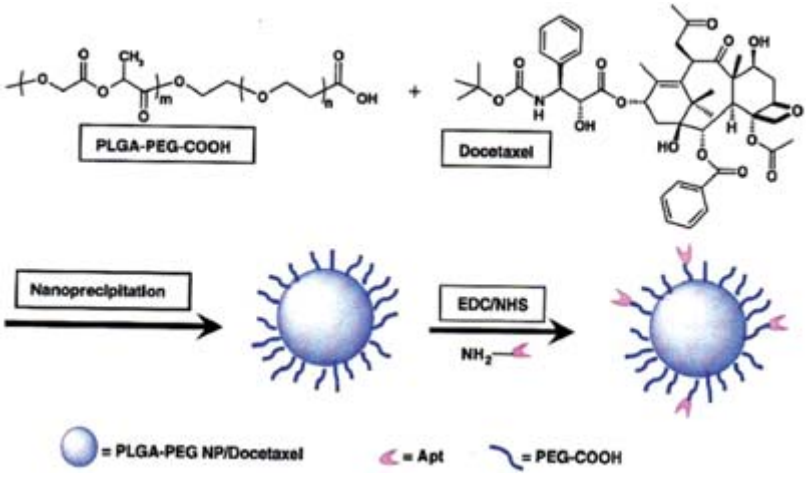


Figura 8.11. *Nanopartículas de docetaxel preparadas por el método de nanoprecipitación a las que se fija covalentemente, a través del grupo amino, el aptámero A10ARN.*

Vectorización vía sensibilidad a estímulos

El desarrollo de nanosistemas sensibles a ciertos estímulos está recibiendo un gran interés y se basan en que los tejidos tumorales tienen un pH más bajo y una temperatura más elevada que los tejidos normales con lo que es posible que el fármaco sea liberado solo cuando se dan estas especiales características fisiopatológicas de los tumores; igualmente, la presencia de determinados sistemas enzimáticos en tejidos tumorales, puede ser utilizada para conseguir una liberación del fármaco vía estímulos externos.

En el caso de los liposomas se pueden obtener sistemas pH sensibles con la inclusión de DOPE (dioleilfosfatidil etanolamina) y otros lípidos ligeramente ácidos como colesterilhemisuccinato o ácido oleico, PEG carboxilados o copolímeros de derivados hidrofóbicos de N- isopropilacrilamida (NIPAM). Estos sistemas a pH neutro mantienen la estructura de la bicapa lipídica pero a pH ácido sufren una protonización, se colapsan y sufren una desestabilización con transición de la fase laminar a hexagonal y rotura de la bicapa lipídica que permite la rápida liberación del fármaco.

Los liposomas pH sensibles inicialmente preparados tenían carácter aniónico a pH fisiológico de 7,4 por lo que existía una repulsión electrostática con la carga negativa de la membrana celular. Los últimos estudios con liposomas pH sensibles se orientan hacia una unión covalente de dife-

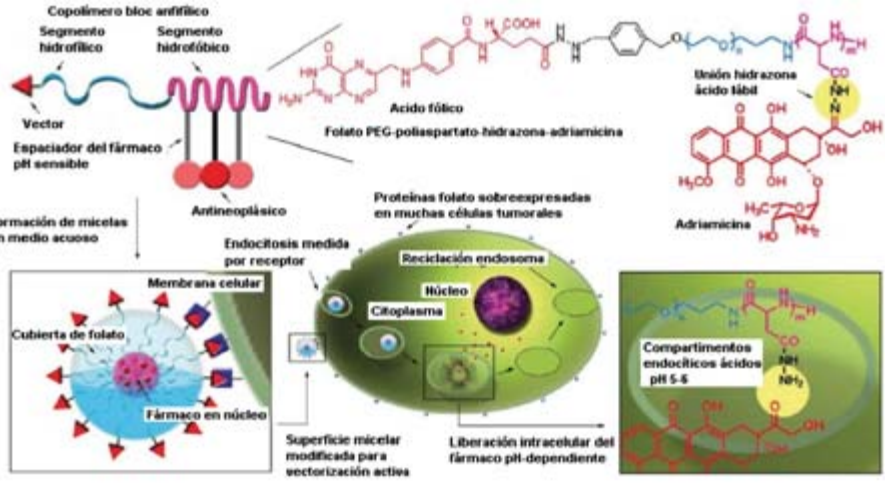


FIGURA 8.12. *Esquema de la actuación de micelas poliméricas vectorizadas constituidas por el polímero Fólico-poli (etilenglicol) poli (aspartato-hidrazona-adriamicina).*

rentes ligandos conteniendo grupos amino, como péptidos y utilizar derivados de DOPE como citraconil DOPE o la combinación de fosfatidilcolina-glicirricina.

En el caso de las micelas poliméricas se puede conseguir una unión pH sensible mediante ciertas uniones como la unión hidrazona; recurriendo a este procedimiento se han preparado micelas de bloques multifuncionales a base de folato-PEG y poliaspartato hidrazona adriamicina lo cual permite una endocitosis mediada por receptor folato y que el antineoplásico se libere por efecto del pH ácido existente en el endosoma (Figura 8.12). En definitiva estas micelas poliméricas se comportan como excelentes sistemas inteligentes que permiten la liberación fármacos en el interior de la célula.

Para dotar a las micelas poliméricas y a los hidrogeles de propiedades modulables por cambio de pH se incorporan a su estructura polímeros con grupos ionizables. Una modificación del pH en torno al pKa de uno de estos grupos afectará de manera muy importante a su grado de ionización y a su estado de hidratación que puede conducir a la desestabilización del núcleo de la micela o, si se trata de un hidrogel, a un marcado aumento del volumen. El pH crítico desencadenante de la respuesta se puede ajustar a las necesidades concretas modificando el pKa de los grupos ionizables del polímero mediante la introducción de comonómeros hidrofóbicos.

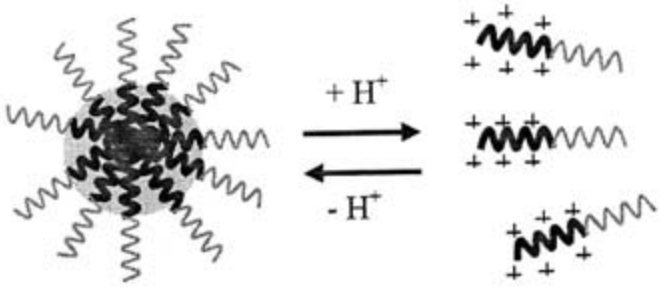


Figura 8.13. *Efecto de un cambio de pH sobre la agregación de polímeros anfifílicos sensibles a este estímulo.*

Por ejemplo, para conseguir una liberación selectiva en tejidos tumorales, se han ensayado micelas formadas por copolímeros anfifílicos que contienen grupos amino en uno de sus bloques. Estas micelas pueden responder a cambios de pH en un intervalo muy estrecho. En un medio de pH superior al pKa, los bloques no estan ionizados y se muestran con un carácter hidrofóbico, pudiendo formar el núcleo micelar. Cuando el pH desciende y los grupos se protonizan, se incrementa la hidrofilia y se produce la rotura de la micela y la liberación del fármaco que contiene (Figura 8.13).

El poli (2 vinilpiridina)-b-poli (óxido de etileno), el poli (2 (dimetilamino)etil metacrilato)-b-poli (óxido de etileno) o el poli (óxido de etileno)-b-poli (L-histidina) se autoagregan a pH mayor o igual a 7 y experimentan una rotura micelar reversible cuando el medio se hace ligeramente ácido. Las micelas de estos polímeros retienen el fármaco mientras se encuentran en el torrente circulatorio, se acumulan en los tejidos tumorales por el efecto EPR, penetran en el interior de la célula liberándose el fármaco de los endosomas.

La liberación selectiva que se consigue con estos sistemas micelares puede contribuir a mejorar la eficacia de los tratamientos antineoplásicos, reduciendo al mismo tiempo sus efectos secundarios. En comparación con los liposomas ya comercializados como portadores de estos fármacos, las micelas poliméricas son más estables frente a la dilución y por su menor tamaño de partícula penetran mas eficazmente en pequeños tumores sólidos.

La combinación de sistemas pH sensibles con ligandos específicos se ha descrito para liposomas pH-sensibles conteniendo ácido fólico o transferrina: igualmente se han preparado micelas pH sensibles conteniendo adriamicina o doxorrubicina y ácido fólico que han mostrado su utilidad *in vivo* en animales de experimentación.

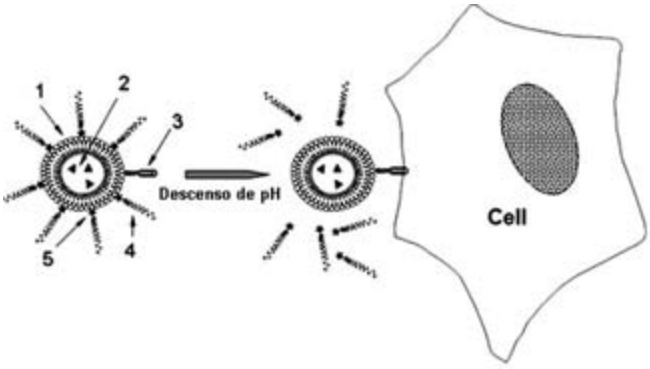


FIGURA 8.14. *Vectorización con función oculta. El nanosistema (1) conteniendo el fármaco (2) lleva un internalizador (3) que va protegido durante la biodistribución por cadenas de polímeros protector (4), unidas al liposoma por uniones pH lábiles (5).*

Unos nuevos sistemas, denominados con funciones ocultas transitorias, están constituidos por liposomas estéricamente estabilizados con cadenas de PEG ancladas a los lípidos; estas cadenas ocultan a otros grupos funcionales como ligandos internalizadores como ácido fólico, transferina o péptidos fusógenos que favorecen la internalización del liposoma. Mientras el sistema se encuentra en la circulación sanguínea las funciones ocultas están protegidas por las cadenas poliméricas pero cuando el sistema alcanza un tejido tumoral las cadenas de PEG se liberan y quedan libres los restantes grupos funcionales presentes en su superficie (Figura 8.14).

Una curiosa aplicación de los nanosistemas pH sensibles es la utilización de nanogeles virus miméticos, propuesta por Lee y Kim, que están constituidos por un núcleo hidrofóbico de poli (His-co-Phe), conteniendo doxorubicina como fármaco, una cubierta de PEG que sirve unión entre el núcleo y una cubierta de albúmina (Figura 8.15). A pH superior a 6,8 el sistema tiene un tamaño de 55 nm pero cuando es inferior a 6,4 se expande hasta un tamaño de 355 nm y permite la liberación del principio activo.

Estos sistemas cuando se internalizan y forman un endosoma se produce una protonización de la poliHis y el aumento de tamaño produce la liberación del citostático y la rotura de la membrana lisosomal, pero al encontrarse en el citosol el nanogel adquiere su tamaño inicial. El citostático induce apoptosis y el nanosistema queda libre para actuar sobre células vecinas (Figura 8.16).

Los liposomas termosensibles son sistemas cuya membrana lipídica es estable a 37 ºC pero presentan una temperatura de transición de fase cercana a los

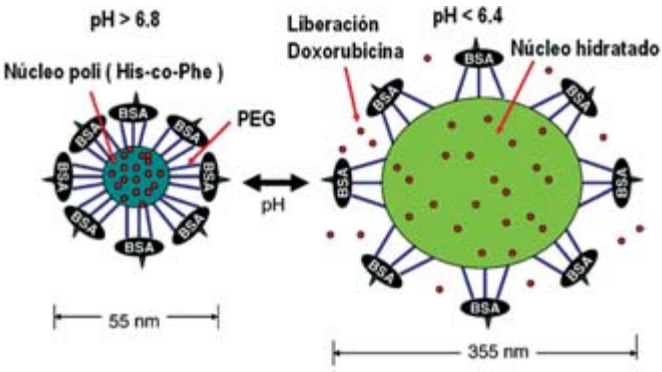


Figura 8.15. *Representación esquemática de un nanogel virus mimético.*

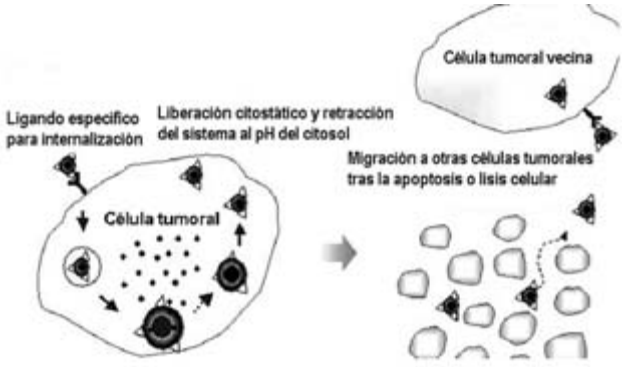


Figura 8.16. *El nanogel virus mimético actua selectivamente sobre células tumorales, las destruye y emigra hacia otras células vecinas.*

39 ºC, temperatura existente en masas tumorales o bien se puede proceder a un calentamiento externo, con lo que se modifica la estructura de la bicapa lipídica y tiene lugar la liberación del principio activo. Ello da lugar a que la cantidad de citostático liberado en el tumor es mucho más elevada, tal como se puede apreciar en la Figura 8.17.

Como componentes de éste tipo de liposomas se ha propuesto recientemente la incorporación de lisofosfolípidos en fase gel. Un ejemplo de la utilización clínica de liposomas termosensibles es el siguiente:

- Temperature-sensitive liposomal doxorubicin and hyperthermia in treating women with locally recurrent breast cancer (Fase I).

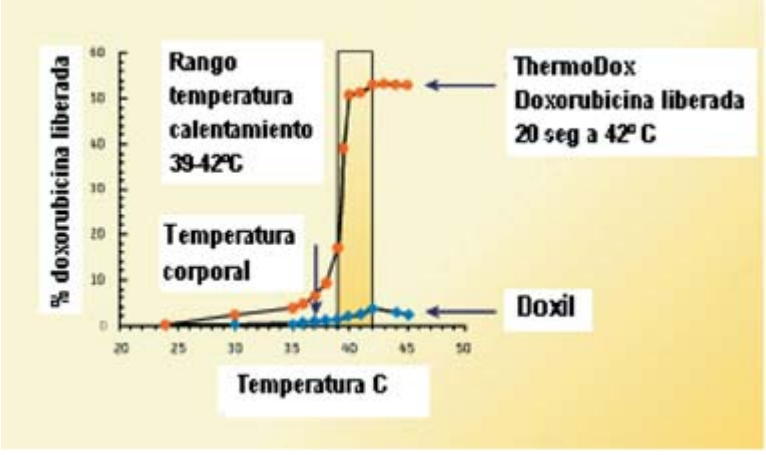


FIGURA 8.17. *Porcentajes de doxorubicina liberada in vitro a 39-42 ºC a partir de Doxil® y ThermoDox®.*

Los pacientes recibieron doxorubicina liposomal (ThermoDox®) en perfusión i. v. durante 30 minutos seguida de una hipertermia en la axila o zona lateral del pecho durante 1-2 horas repitiéndose el tratamiento cada 21-35 días y al menos durante 6 ciclos.

Son tambien interesantes los ensayos clínicos realizados con ThermoDox en carcinoma hepatocelular en los que, con mayor frecuencia, se utiliza la ablación por radiofrecuencia. Esta técnica puede ser asociada a la utilización de ThermoDox ya que a la ablación se une la liberación de una importante cantidad de doxorubicina que actua sobre las células tumorales de la periferia del tumor en las que no se alcanza una temperatura suficiente para producir la ablación. Los ensayos clínicos recogidos por ClinicalTrials.gov son los siguientes:

- Heat activated liposomal doxorubicin and radiofrequency ablation in treating patients with primary or metastatic liver tumors.
- Phase 3 study of ThermoDox with radiofrequency ablation (RFA) in treatment of hepatocellular carcinoma (HCC).
- A study of ThermoDox in combination with radiofrequency ablation (RFA) in primary and metastatic tumors of the liver.

La hidrosolubilidad de los polímeros termosensibles, que se emplean para preparar sistemas inteligentes, los mantienen hidratados y con las interacciones intra e interpoliméricas minimizadas por debajo de su Temperatura Crítica de Disolución (LCST). Cuando se supera este valor crítico, los puentes de hidró-

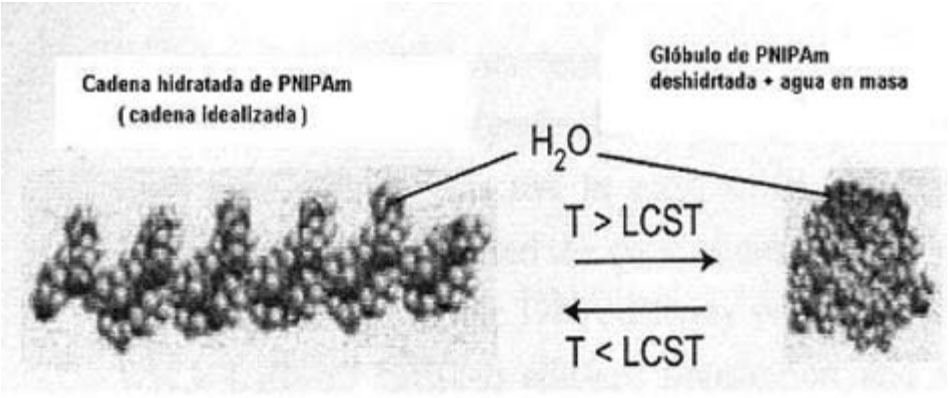


Figura 8.18. *Transición de fases que experimenta la poli (N-isopropilacrilamida) en torno a la temperatura crítica de disolución (LCST).*

geno polímero-agua se destruyen, se intensifican las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas y el agua se expulsa del entramado polimérico. La LCST de un polímero se puede incrementar o reducir introduciendo en su estructura grupos hidrofílicos o hidrofóbicos. Para obtener micelas poliméricas sensibles a cambios de temperatura se utilizan copolímeros anfifílicos con poli (N-isoropilacrilamida) (PNIPA) o uno de sus derivados formando parte de los segmentos hidrofílicos o hidrofóbicos. En el primer caso, la formación de la corona solo se produce a temperaturas inferiores a la LCST; por encima de este valor, las micelas se rompen y el fármaco se libera (Figura 8.18).

Un ejemplo de estos sistemas está constituido por un copolímero conteniendo bloques de poliláctico y de PNIPA copolimerizado con dimetilacrilamida que presenta una LCST próxima a 40 ºC. Las micelas de este copolímero cargadas con doxirubicina ceden muy lentamente el fármaco a 37 ºC, pero la liberan con rapidez a 40 ºC.

La sobreexpresión de ciertos sistemas enzimáticos en tejidos tumorales también ha sido objeto de investigación con la finalidad de conseguir una vectorización vía estímulo externo como por ejemplo la fosfolipasa A2 o proteasas como metaloproteasas. La inclusión de cadenas de PEG permite que los liposomas o nanopartículas lipídicas presenten una larga permanencia en la circulación sanguínea pero disminuyen la interacción con las membranas celulares lo cual representa un importante problema para aquellas formulaciones que contienen fármacos que deben actuar en el interior de la célula. Para resolver este dilema se ha propuesto recientemente que entre las cadenas lipídicas y de PEG se sitúe un espaciador constituido por un péptido cuya unión se rompe por la

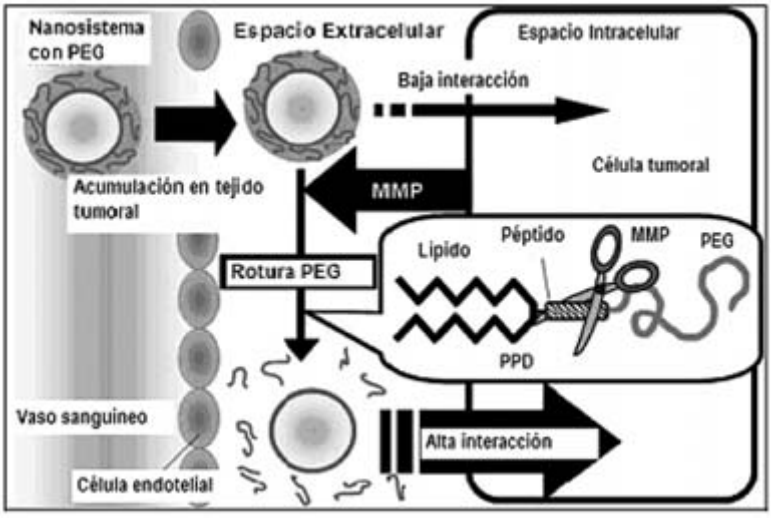


FIGURA 8.19. *Esquema de un lipoplex que posee un péptido espaciador entre el nanosistema y las cadenas de PEG. Por la acción de las metaloproteasas, existentes en el espacio extracelular, se desprenden las cadenas poliméricas de PEG.*

acción de metaloproteasas existentes en el fluido extracelular de numerosos tumores (Figura 8.19).

Dentro de este apartado de sistemas que responden a estímulos externos podemos señalar las nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe304) en un medio acuoso que contiene agentes tensoativos para impedir la agregación de las nanopartículas. Estos sistemas se conocen actualmente como ferrofluidos y entre sus aplicaciones biomédicas destacan como agentes de contraste y más recientemente en el tratamiento del cáncer por hipertermia. Desde hace años están comercializadas nanopartículas de ferritas recubiertas de dextrano que se emplean como agentes de contraste de RMN en la detección de tumores hepáticos. Partículas de unos 50 nm se utilizan en angiografias y en linfografias de RMN para la detección de metástasis (Sinerem®) así como en la mejora de imágenes de RMN en tumores intracraneales.

La hipertermia inducida al someter nanopartículas superparamagnésticas a la acción de un campo magnético rápidamente alternante, como método que produce la muerte de células tumorales, se conoce desde hace varios años si bien ha sido en los dos últimos años cuando se ha vislumbrado la posibilidad de utilización en humanos. En Mayo de 2007 el Dr. Johannnsen ha publicado en el International Journal of Hyperthermia los resultados obtenidos en 10 pacientes

con cáncer de próstata localmente recurrente a los que inyecta nanopartículas magnéticas directamente en el tumor usando imágenes fluoroscópicas y de ultrasonidos. Sobre estas partículas se aplica un campo magnético que permite alcanzar temperaturas de 55 ºC produciéndose la muerte de las células tumorales. El tratamiento dura 1 hora y se repite semanalmente durante 6 semanas. La firma alemana MagForce Nanotechnologies GmbH, que ha desarrollado el ferrofluido uilizado en este ensayo, piensa que en unos cinco años dispondrá de nanopartículas magnéticas que contendrán anticuerpos monoclonales u hormonas que permitirán una orientación hacia las células tumorales.

Como resumen de lo expuesto podemos decir que la actual nanotecnología farmacéutica tiende a la utilización de sistemas multifuncionales para la cual, en su superficie se insertan ligandos de muy diferente naturaleza que permitan no solo una estabilización del sistema en los fluidos biológicos sino también una orientación selectiva hacia determinados órganos y tejidos, que faciliten el paso a través de la membranas celulares y que puedan ser utilizados también como sistemas de diagnóstico por imagen. Esta evolución de los nanosistemas es la que, de forma gráfica se recoge en la Figura 8.20.

TERAPÉUTICA INTRACELULAR

Muchos fármacos, y particularmente los antineoplásicos, tienen sus dianas en el interior de las células tumorales por lo que la liberación intracelular se convierte en la clave para una eficiente respuesta terapéutica y además abre el camino para el desarrollo de la Terapia Génica ya que, como dice Vermer, «solo hay tres problemas en terapia génica: liberación, liberación y liberación». Una condición importante para conseguir una efectiva liberación de un fármaco, que tenga su diana en el interior de la célula, es que el sistema que lo transporta lo proteja durante su permanencia en el endolisosoma y que rápidamente lo abandone. Un cierto número de vectores han sido explorados para una liberación específica intracelular y aunque su eficiencia de liberación sea alta son incapaces de mantener niveles terapéuticos por largo tiempo. Por ello el centro de atención actual es la obtención de sistemas que no solo protejan al fármaco de su degradación sino que, una vez que se encuentran en el citosol permitan una liberación controlada durante un largo tiempo.

Desde el año 1992, en que comenzaron a utilizarse liposomas catiónicos como vehículos portadores de plásmidos y ADN, los lipoplex constituyen los sistemas no víricos mas empleados en terapia génica ya que tiene lugar una interacción electrostática con el ADN, produciendo su condensación e inter-

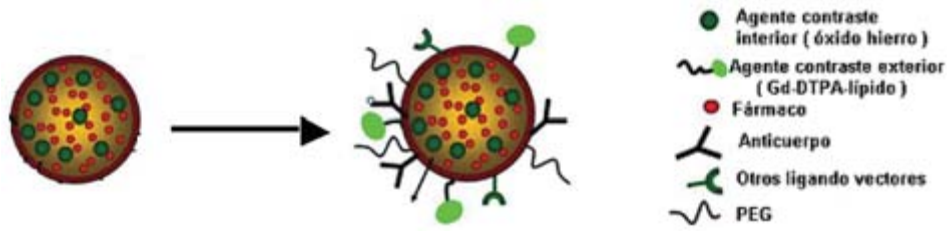


FIGURA 8.20. *Esquema de la evolución tecnológica de los nanosistemas monofuncionales a nanosistemas multifuncionales.*

nalización fundamentalmente por endocitosis. Estos liposomas se preparan a partir de mezclas de lípidos catiónicos y zwiterion. Los lípidos catiónicos estan constituidos por estructuras anfifílicas con restos apolar formados por dos cadenas de ácidos grasos y una cabeza polar catiónica que es la que marca la diferencia entre ellos siendo las aminas cuaternarias y poliaminas como espermina, espermidina, etc., los grupos funcionales más utilizados. Actualmente se encuentran comercializados mas de una veintena de lípidos catiónicos siendo los de mayor utilización la mezcla a partes iguales dioleiloxipropil trimetilamonio (DOTMA) y dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) que se conoce con el nombre de Lipofectina; el dioctadecildiamidodecilespermina (DOGS) con el nombre de Transfectan y el 2,2 dioleoxi N-(2(espermincarboxiamido)etil) -N-N demitil 1 propanamino (DOSPA) con el nombre de lipofectamina.

Diversos estudios han demostrado la citotoxicidad de los liposomas catiónicos debido a su fuerte carga catiónica, si bien esta citotoxicidad se disminuye a medida que el lipoplex se compleja con el ADN. Para obviar estos inconvenientes se ha pensado en substituirlos por liposomas aniónicos a base de 1,2 dimiristoil-sn-glicero 3- (fosfo-rac-1 glicerol) (DMPG) y DOPE a cuya mezcla es posible la incorporación de ADN complejado con ión calcio. Esta situación ha determinado que los liposomas aniónicos sean hoy considerados útiles para la transferencia de ADN en líneas celulares en las que los liposomas catiónicos han mostrado su citotoxicidad.

La protamina, un péptido rico en arginina puede ser empleado antes de la encapsulación por el lipoplex incrementándose la capacidad de transfección adicionandose tambien el lípido DOPE como lípido facilitador. Este sistema ha sido empleado para la liberación de los genes supresores de tumores Rb o E1A; por otra parte la inclusión de péptidos tales como la subunidad influenza HA-2 mejoran la capacidad de transfección.

Los polímeros catióncos también se emplean para formar complejos con ADN, conocidos con los nombres de poliplexes, de los que son particularmente interesantes los complejos con polietilenimina ya que este polímero presenta una especial capacidad de protección lisosomal del ADN por el llamado «efecto esponja de protones» ya que, al ir acidificándose los endolisosomas, la capacidad neutralizante de la polietilenimina provoca la entrada de agua por un efecto osmótico produciendose la rotura de la membrana endolisosomal y la liberación del fármaco al citosol.

Son muy numerosos los trabajos dedicados estudiar la influencia sobre eficacia/citotoxicidad/biodistribución de los poliplexes modificando el peso molecular, fuerza iónica de la solución, potencial zeta, tamaño de partícula y grado de ramificación habiendose encontrado que son el peso molecular (cuanto más bajo menor toxicidad) y el grado de ramificación (las ramificadas poseen menor citotoxicidad) los factores que más influyen en la eficacia/toxicidad mientras que la utilización de derivados de polietilenimina con PEG permite una mayor permanencia del nanosistema en la circulación sanguínea.

La capacidad de trasnfección que presenta la polietilenimina puede incrementarse mediante la introducción de ligandos como anticuerpos monoclonales (por ejemplo el B4G7), ácido fólico o transferrina. Particularmente interesante es la capacidad de transfección que presenta el sistema polietilenimina-PEG-transferrina no solo como sistema de liberación sino tambien para la producción de interleukina 2.

Para cumplir con una buena internalización y un adecuado tráfico intracelular se han propuesto diversos vectores constituidos por un pequeño grupo de polímeros que han sido administrados a humanos y clínicamente validados como no tóxicos. Entre ellos se pueden citar:

- **Poliláctico-poliglicólico**

Constituyen un grupo de polímeros biodegradables y biocompatibles que han sido aprobados por la FDA para su utilización en forma de nanopartículas. Estos nanosistemas son obtenidos generalmente por un proceso de doble emulsificación w/o/w y evaporación del solvente empleando el alcohol polivinílico (PVA) como emulsificante.

Se ha demostrado que la internalización de estas nanopartículas es concentración y tiempo dependiente y tiene lugar parte por pinocitosis de fase fluida y parte a través de los hoyos de clatrina. El tamaño de partícula juega un papel

fundamental ya que, con la misma composición, las nanopartículas < 100 nm muestran una transfección 27 veces mayor que las de tamaño > 100 nm. Son también de gran importancia factores como carga superficial, hidrofilia del polímero y proporción de PVA en el sistema. Una vez formado el endolisosoma se produce una protonización, por el pH ácido del medio, y modificación de la carga superficial de la nanopartícula lo que da lugar a la rotura de la membrana endolisosomal; por otra parte también se ha demostrado que una significativa fracción sufre un proceso de exocitosis el cual depende la proporción de alcohol polivinílico (la exocitosis es menor cuando es baja la proporción de PVA), de su peso molecular y del grado de hidroxilación.

- **Poloxamer**

Son bien conocidas las interacciones que se pueden producir entre numerosos principios activos y los grupos carboxilo terminales de los polímeros poliláctico-glicólico así como el mayor número que se producen durante su proceso hidrolítico y que conducen a la formación de oligómeros y monómeros ácidos. Diversos autores han señalado que la encapsulación con excipientes protectores puede constituir una alternativa para disminuir la interacción entre fármaco y polímero así como neutralizar la acidificación del medio que tiene lugar durante su degradación. Entre las diversas alternativas destacan la inclusión de copolímeros bloque a base polioxietileno y polioxipropileno ya que aumentan de forma significativa la estabilidad y la eficiencia de encapsulación de diferentes proteínas.

En la Figura 8.21 se muestra que el plásmido ADN pEGFP (que codifica la proteína fluorescente verde), cuando se incluye en nanopartículas de poliláctico-glicólico:poloxamer L 121 en proporción 50:50, se encuentra en las dos formas biológicamente activas: superhelicoidal (aproximadamente en un 60%) y circular abierta (aproximadamente en un 40%). Durante el proceso de liberación de dos semanas se siguen observando las dos formas si bien se produce una conversión de la forma superhelicoidal a circular abierta. Este hecho demuestra que los compolímeros bloque mencionados previenen cambios estructurales del plásmido encapsulado mientras que si se producen cuando se utilizan nanopartícula de poliláctco-glicólico.

Los poloxamer y poloxaminas han demostrado la capacidad de interaccionar con varias moléculas efectoras y activar la expresión de genes que son cruciales para inhibir el desarrollo del sistema conocido como resistencia múltiple a fármacos (MDR), que se desarrolla rápidamente en ciertos tipos de células tu-

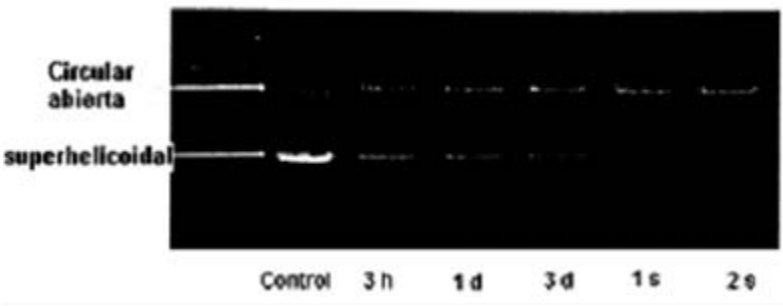


Figura 8.21. *Análisis estructural del plásmido ADN pEGFP liberado a diferentes tiempos a partir de nanopartículas PLGA: Pluronic L 121.*

morales, y puede considerarse como una modificación del fenotipo provocado por fármacos. En los tumores con fenotipo MDR sobreexpresado aparecen transportadores como la glicoproteína P (MDR1), resistencia múliple a fármacos asociada a proteínas (MPR) y proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) que pertenecen a una superfamilia de casette de proteínas de unión a ATP las cuales dan lugar a bombas que transportan el fármaco al exterior de la célula reduciendose la citotoxicidad. Al mismo tiempo el sistema de detoxificación glutation/glutation S-transferasa está activado y finalmente el fármaco también es englobado en vesículas endoplasmáticas que participan en su salida al exterior.

Tal como se muestra en la Figura 8.22 el empleo de los poloxamer inhibe la glicoproteína P y aumenta de forma importante la citoxicidad de muchos antineoplásicos en células tumorales con elevada actividad MDR. Este efecto es múltiple ya que por una parte se disminuye la actividad de la glicoproteína ATPasa, tiene lugar una depleción intracelular de ATP así como una inhibición del sistema glutation-glutation S-transferasa y la formación de vesículas endoplasmáticas.

Las dos dianas de actuación de los poloxamer son la membrana celular, en la que se localiza la glicoproteína P, y la membrana de la mitocondria en la que afecta a los transportadores de flujo del fármaco y cadena respiratoria. La capacidad de inhibir el sistema glicoproteína P-ATPasa de los poloxamer aumenta al incrementarse la longitud hidrofóbica de polioxipropileno de tal forma que la mayor actividad de estos copolímeros se presenta en aquellos que poseen una longitud intermedia de la cadena de polioxipropileno y una relativamente corta cadena de polioxietileno.

En cuanto a la cadena respiratoria ésta se ve fuertemente inhibida por los poloxamer en células MDR en comparación con células no MDR lo cual

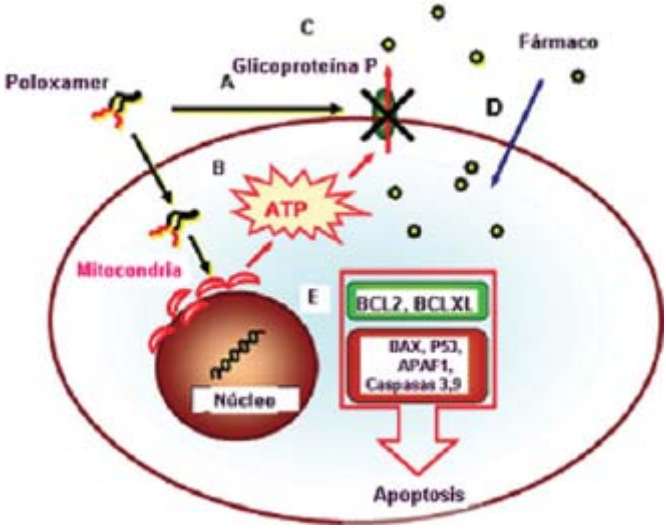


FIGURA 8.22. *Mecanismos de actuación de los poloxamer sobre las células tumorales con fenotipo MDR1 sobrexpresado.*

parece que está relacionado con el hecho de que las primeras utilizan los ácidos grasos como fuente de energía en lugar de glucosa. La selectividad que muestran los poloxamer sobre las células con fenotipo MRD1 sobreexpresado es único y constituye un buen ejemplo de cómo el MDR1 es un buen marcador farmacogenómico para determinar la efectividad de formulaciones poloxamer-fármaco; además ello ha reforzado los ensayos clínicos de formulaciones de doxorubicina-poloxamer en cáncer de esófago (formulación comentada anteriormente) y otros que muestran una alta sobreexpresión de MDR1 y en los que frecuentemente se presentan rápidas resistencias.

Aunque las formulaciones de medicamentos incorporados a polímeros son empleadas para mejorar la liberación del principio activo sin embargo existen cada vez mas evidencias que los polímeros pueden también modificar señales de transducción intracelular e incrementar la eficacia terapéutica del principio activo. Ejemplo de ello son antineoplásicos fijados a polímeros o bien éstos incluidos en micelas poliméricas o nanopartículas; así la doxorubicina fijada al poloxamer Pluronic P 85 incrementa su actividad debido a que el polímero incrementa la expresión de genes proapoptóticos BAX, P53, APAF1, caspasa 9 y 3 mientras que la defensa celular antiapoptótica BCL2 está disminuida.

- **Polietilenglicoles**

La camptotecina fijada sobre polietilenglicoles incrementa su efecto citotóxico al estar considerablemente incrementadas las expresiones de los genes activadores de caspasas SMAC y APAF1 así como las caspasas 9 y 3; en este caso también se encuentran sobreexpresados los genes ligados a la defensa celular BCL2 y BCL-XL pero esta inducción se desarrolla más lentamente por lo que el resultado final es un incremento de la muerte celular. Igualmente micelas poliméricas de polietilenglicol-ácido poliglutámico conteniendo cisplatino muestran una actividad diferente sobre los genes que regulan el ciclo celular, apoptosis, detoxificación y reparación de ADN; concretamente las micelas poliméricas muestran una disminución en la expresión de los genes que codifican integrinas y metaloproteasas mientras que estos genes se encuentran sobreexpresados cuando se administra solo cisplatino. Este hecho tiene interés ya que las mencionadas micelas pueden reducir la invasión tumoral, metástasis y angiogénesis proporcionando beneficios terapéuticos adicionales.

La firma Enzon Pharmaceuticals ha realizado ensayos preclínicos con un metabolito activo de la camptotecina (SN38, Pegamotecan) unido a un PEG de cuatro ramas de 40 kD obteniéndose el conjugado EZN 2208 (Figura 8.23) con el que se están realizando los siguientes ensayos clínicos fase I (ClinicalTrials.gov):

- A phase I, study to evaluate the safety and tolerability of intravenous EZN-2208 in patients with advanced solid tumors or lymphoma (EZN-2208-01).
- A pase I study to evaluate the safety and tolerability of intravenous EZN-2208 in patients with advanced solid tumors or lymphoma (EZN-2208-02).

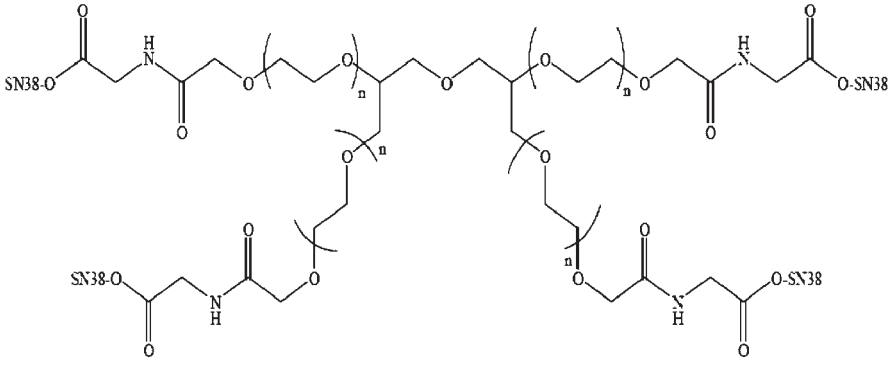


Figura 8.23. *Estructura del conjugado EZN 2208 (Pegamotecan).*

- Efacy of Pegamotecan (PEG-camptothecin) in localizad or metastatic cancer of stomach or gastroesophageal junction (terminado).
- A phase II study of pegylated-camptothecin (pegamotecan) in the treatment of locally advanced and metastatic gastric and gastro-esophageal junction adenocarcinoma: Scott L.C. (2009): Cancer Chemtother. Pharmacol: 63 (2); 363 [2] 370.

- **Copolímero ácido maleico-estireno**

La neocarzinostatina es una pequeña proteína de 12 kD asociada con un cromóforo de bajo peso molecular. La proteína es rápidamente eliminada por vía renal y su citotoxicidad no es específica. Para subsanar esta desfavorable disposición se une al copolímero maleico-estireno (SMANCS), con lo que se logra una eliminación lenta, disuelto en el contraste lipídico Lipiodol y administrado por la arteria femoral para acceder al tumor vía arteria hepática ha mostrado satisfactorios resultados en el tratamiento de carcinoma hepatocelular con una clara reducción del tamaño del tumor (95% de los casos). Se encuentra comercializado con el nombre de Zinostatin Stimalamer®.

- **Hidroxipropilmetacrilamida**

Constituyen un grupo de polímeros, no tóxicos y no inmunogénicos, que se emplean para unirles covalentemente con determinados principios activos fundamentalmentalmente antineoplásicos. Entre ellos tal vez el más ampliamente estudiado es el PK1 que lleva el polímero, de peso molecular determinado, unido a doxorubicina a través de un enlace tetrapéptido (glic-Fen-Leu-Glic) el cual es estable en plasma pero roto intracelularmente por medio de proteasas tiol-dependientes lisosomales, particularmente catepsinas. A este conjugado se le ha incorporado galactosamina que se une al receptor asialoglicoproteína hepática, obteniéndose una estructura como la recogida en la Figura 8.24.

Actualmente se encuentra en Fase II el estudio clínco siguiente:

- Doxorubicin in treating women with advanced breast cancer.

Los datos de ensayos clínicos realizados con este conjugado, en pacientes con cancer hepático primario o metastático, muestran que la dosis recomendada es de 120 mg/m^2 de doxorubicina (frente a los 70 mg/m^2 utilizados cuando se utiliza solo doxorubicina), administrada durante una perfusión de 1 h, cada

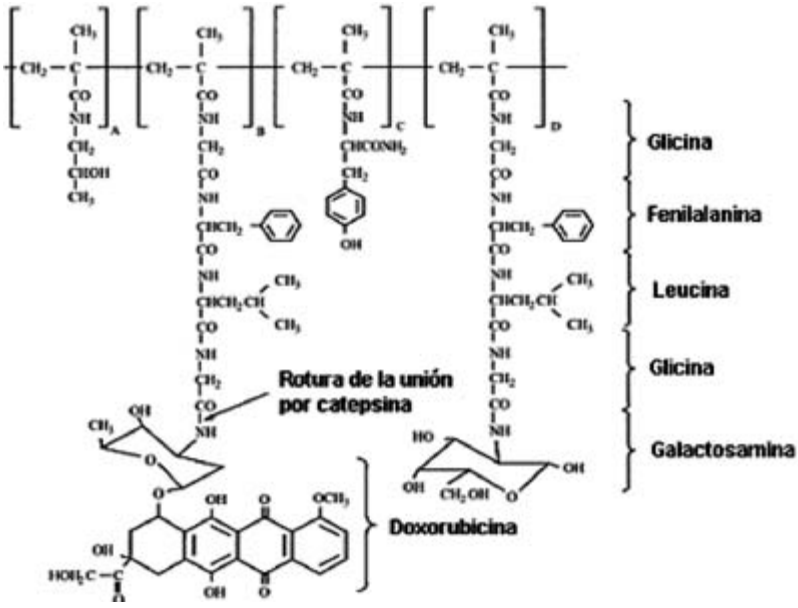


Figura 8.24. *Estructura del conjugado hidroxipropilmetacrilamida con galactosamina y doxorubicina.*

3 semanas y un máximo de 6 ciclos. Por otra parte los análisis de doxorubicina intracelular muestran una concentración entre 15-50 veces mayor.

Otro conjugado (AP 5280) que está siendo evaluado clínicamente contiene oxaliplatino unido a hidroxipropilmetacrilamida por medio de un tetrapéptido (glicina-fenilalanina-leucina-glicina) cuyo –COOH de la glicina terminal se une a un ácido aminomalónico quelante que se une al complejo de platino (Figura 8.25). Este conjugado es inactivo en plasma pero se concentra en el fluido extravascular tumoral por un efecto EPR y posteriormente se activa por proteasas extra o intracelulares.

- Rademaker-Lakhai y col.: (2004): A phase I and pharmacological study of the platinum polymer AP5280 given as a intravenous infusion once every 3 weeks in patients with solid tumors: Clinical Cancer Res.: 10 (10); 3386-33925.

Otro derivado es el denominado AP 5436 (ProLindac) que posee como ligando, entre la hidroxipropilacrilamida y el oxaliplatino, una cadena de tres restos de glicina. Se encuentra en estudio clínico en Fase II:

- AP5436 or oxaliplatin in treating patients with metastatic and/or unresectable recurrent head and neck cancer.

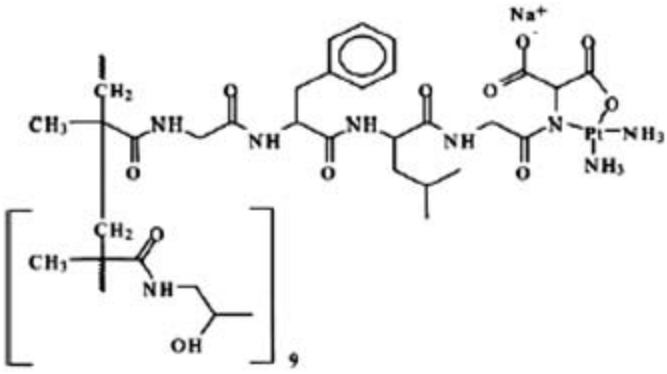


FIGURA 8.25. *Estructura química del conjugado AP 5280.*

- AP5436, a pH-dependent polymer vectorized DACH, is safe at pharmacodynamically active doses: results from an ongoing Phase II trial in potentially platinum-sensitive ovarian cancer (OC) patients.

Según los ensayos clínicos mencionados el compuesto se administra en perfusión i.v. durante una hora a dosis de 640 mg/m^2 de platino cada tres semanas y descanso de una semana.

Como se ha mencionado anteriormente la inhibición de la angiogénesis constituye uno de los puntos clave en el tratamiento de los tumores sólidos siendo buena prueba de ello que existan actualmente más de 30 inhibidores de la angiogénesis entre los cuales destaca el TNP 470 que es un análogo sintético de la fumagilina el cual, en fases preclícicas, ha demostrado poseer actividad antitumoral solo o asociado a terapia convencional pero en ensayos en humanos ha mostrado neurotoxicidad a las dosis necesarias para obtener respuesta antitumoral. Esta toxicidad se ve notablemente disminuida cuando el TNP 470 se une a una hidroxipropilacrilamida a través de un tetrapéptido de glicina-fenilalanina-leucina-glicina con una unión etilendiamina (Figura 8.26), ya que no se obtienen elevados niveles plasmáticos del principio activo, se impide su acceso al fluido cerebroespinal, se aumenta su semivida y se acumula en tejidos con neovascularización en donde se libera el pincipio activo que actua como potente inhibidor de la angiogénesis.

- **Poliglutamatos**

Constituyen un reciente grupo de polímeros patentados por Cell Therapeutics (Polyglumex). Uno de estos polímeros ha sido unido al paclitaxel (Xyotax®)

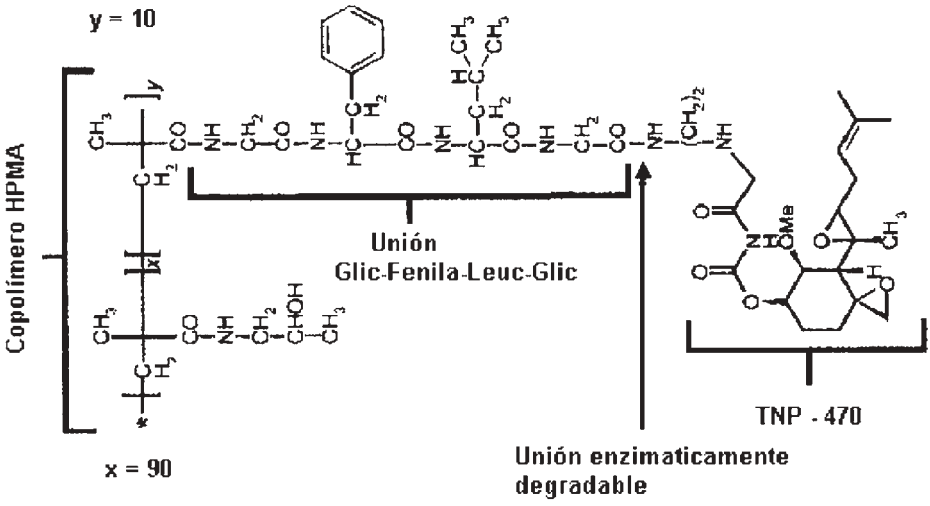


Figura 8.26. *Estructura del conjugado TNP 470- HPMA.*

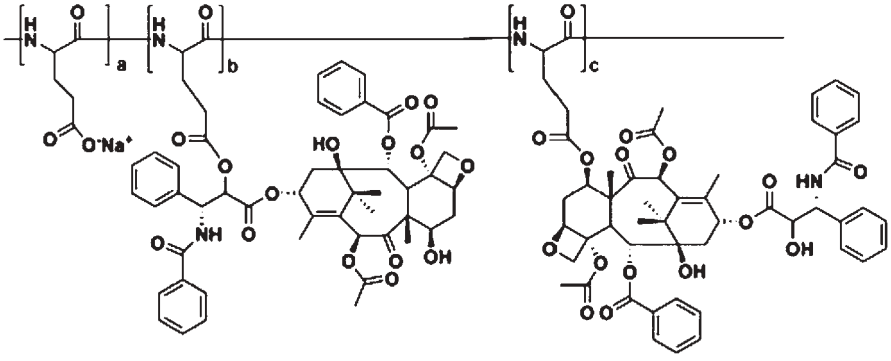


Figura 8.27. *Estructura química del conjugado poliglutámico-paclitaxel (Xyotax®).*

(Figura 8.27). Basándose en los resultados de estudios clínicos, realizados sobre mas de 1.200 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, se encuentra que los niveles plasmáticos de paclitaxel son 100 veces más bajos cuando se utiliza Xyotax que cuando se emplea el citostático actualmente comercializado; este único perfil puede ser el responsable de que no se produzca una pérdida de pelo y de la baja incidencia de la neutropenia severa que se observa en los estudios clínicos. Al mismo tiempo se encuentra un significativo incremento de la supervivencia y que ésta es mayor en mujeres lo cual parece deberse a la co-

rrelación existente entre niveles plasmáticos de estrógenos y un aumento de la expresión de catepsina B.

Xyotax® se dispone en viales de 20 ml con 250 mg de paclitaxel; el contenido del vial se disuelve en 10 ml de suero glucosado y la dosis necesaria se diluye hasta un volumen adecuado con suero glucosado que se administra en perfusión durante 30 minutos. La dosis para pacientes con cáncer de pulmón no microcítico es de 250 mg/m^2 cada tres semanas.

Según el NIH de Estados Unidos se encuentran 20 ensayos clínicos de Xyotax en diversas fases II o III bien en terapia única, asociado a otros citostáticos como capecitabina, carboplatino, estradiol, o en combinación con radioterapia.

Otro fármaco que se encuentra actualmente en fase I/II de ensayo clínico es la camptoteciona cuya escasa solubilidad y efectos tóxicos limitan seriamente su utilización. Cuando este antineoplásico se une a un poliglutamato se obtiene un producto soluble (CT 2106) que unido a 5 fluoruracilo y ácido folínico se ha utilizado en pacientes con cáncer de colon y en forma aislada en cáncer de ovario. Los resultados preliminares muestran que el producto es bien tolerado, no se presentan las severas diarreas, cálculos renales y hematuria que se presenta cuando se utiliza camptotecina. Los estudios clínicos disponibles en el tratamiento del cáncer son los siguientes:

- CT-2106 for the second line treatment of ovarian cancer (ClinicalTrials.gov).
- Phase I/II CT 2106 and 5-FU/FA in colorectal cancer (ClinicalTrials.gov).
- Polyglutamate camptothecin in treating patients with advanced cancer (ClinicalTrials.gov).
- Homsi J y col.: (2007)Phase I trial of poly-L-glutamate-camptothecin (CT 2106) administered weekly in patients with advanced solid malignancies: Clin. Cancer Res.: 13 (19); 5855-5861.

CT 2106 se administra en perfusión de 10 minutos los días 1,8 y 15 de cada 28 días a la dosis máxima tolerable de 25 mg/m^2.

La compañía Insert Therapeutics utiliza ciclodextrinas lineales hidrosolubles unidas a polímeros (Cyclosert®) que pueden ser neutrras, o con carga positiva o negativa y con las que se pueden englobar moléculas sencillas, oligonucleótidos o plásmidos.

Esta firma ha sintetizado un conjugado de camptotecina (IT 101) unida, a través de una glicina con una betaciclodextrina y PEG (Figura 8.28) con lo que

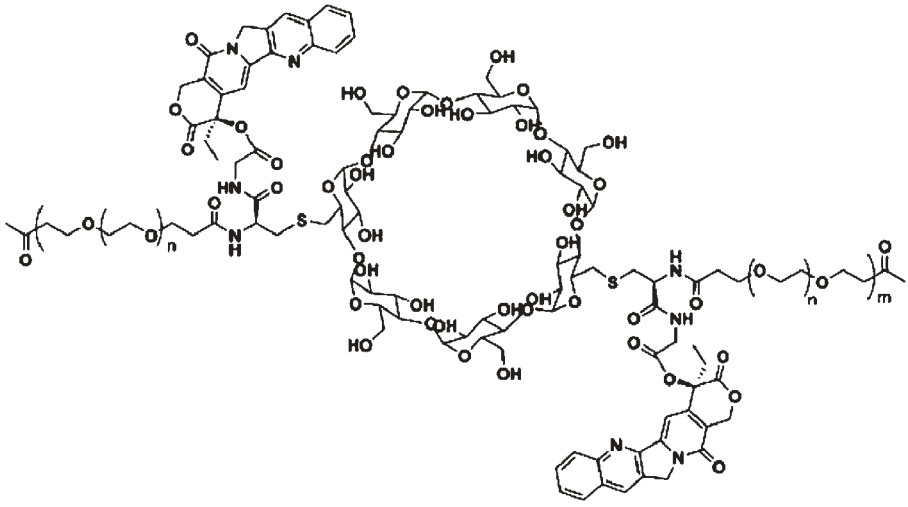


Figura 8.28. *Estructura química del conjugado IT 101.*

se consigue un incremento de más de mil veces la hidrosolubilidad de la camptotecina. El conjugado es inactivo en plasma pero en el espacio extravascular tumoral se libera por hidrólisis el antineoplásico.

Se ha iniciado un ensayo clínico Fase I en el que IT 101 se inyecta los días 1, 8 y 15, seguido de una semana de descanso.

- Study of IT-101 in the treatment of advanced solid tumors (ClinicalTrials.gov).
- Efficacy study of maintenance IT-101 therapy for ovarian cancer patients (ClinicalTrials.gov).

Durante los últimos años se ha podido ir descifrando los nucleótidos del ADN en células humanas y ello está permitiendo la posibilidad de intervenir en este código genético ya sea reemplazando un gen anómalo por uno normal o inhibiendo la expresión de otro gen anómalo.

Dentro de este excitante panorama destacan los avances logrados en esta última posibilidad mediante la estrategia denominada antisentido; si se conoce la secuencia de nucleótidos de un determinado gen anómalo se puede fabricar su contrapartida complementaria y, si se consigue que alcance el núcleo celular, se va a unir a la secuencia respectiva del m-ARN con lo que se detiene la transcripción o traducción en la secuencia de aminoácidos que constituyen una determinada proteína (Figura 8.29).

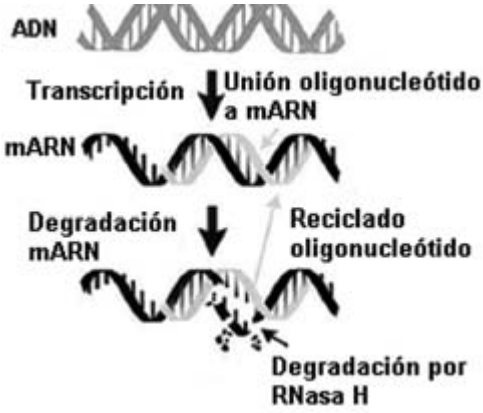


FIGURA 8.29. *Mecanismo de actuación de los oligonuleótidos antisentido.*

Cada gen contiene muchos nucléotidos pero no es necesario obtener la contrapartida total ya que basta solo una pequeña porción que se va a unir a una pequeña parte del m-ARN para bloquearlo y que no pueda transmitir la información.

Los oligonucleótidos muestran una gran inestabilidad ya que en sangre existen nucleasas que rápidamente los degradan e inactivan por lo que éste ha sido el primer problema que se ha tenido que resolver para lo cual se reemplaza la unión fosfato por una de fosfotionato lo que proporciona mayor estabilidad.

Mayores son los problemas referentes a la entrada del oligonucleótido al interior de la célula, su liberación del endosoma y entrada al núcleo. Es precisamente en estos procesos en donde la nanotecnología ha desplegado el enorme potencial que encierra al permitir la construcción de nanosistemas como liposomas, nanopartículas y principalmente nanogeles de polietilenimina que han permitido que se mantengan estables y que puedan desarrollar su acción diversos oligonucleótidos sobre determinados cultivos de células cancerosas o en modelos de cáncer en ratas. Para incrementar la eficacia de estos portadores se utilizan ligandos específicos como por ejemplo para hepatocitos puede ser la galactosa que tiene afinidad para asialoglicoproteinas o lactosa para galactolípidos. Igualmente es muy interesante la modificación de la polietilenimina con b^2ciclodextrinas.

El oblimersen sódico (Genasense®) es un oligonucleótido antisentido formado por 18 bases, con enlace fosfotionato, que uniéndose a su secuencia complementaria de m-ARN éste se destruye enzimáticamente y bloquea la producción de la proteína Bcl-2 que juega un importante papel en la apoptosis de células tumorales de tal forma que su bloqueo las hace más sensibles a otros tratamientos

con citostáticos clásicos. Se presenta en forma de una solución salina isotónica estéril de 10 ml que contiene 300 mg de oblimersan sódico. La utilización del oblimersan se hace por perfusión a la dosis de 5 mg/Kg/día durante cinco días, ciclo que se repite cada tres semanas. Tiene aprobadas las indicaciones para su empleo en leucemia linfocítica crónica y melanoma avanzado. En marzo de 2008 el oblimersan figura en 43 ensayos clínicos en diversos tipos de cáncer, mayoritariamente asociado a otros citostáticos.

Dentro de los diversos oligonucleotidos antisentido que se estan utilizado en ensayos clínicos, generalmente en fases I o II, (EZN-2968; OGX-011; GTI-2040; AEG-35156, etc.) destaca el llamado LErafAON-ETU que es un oligonucleotido antisentido específico para la proteina Raf 1 y que se administra en forma de liposomas por vía i.v. en perfusión bien de forma aislada o asociado a otros citostáticos.

- Phase I study of an easy-to-use intravenous formulation of liposome entrapped c-Raf Antisense Oligonucleotide (LErafAON-ETU) administered on a weekly schedule in patients with advanced cancer.
- Phase I study to determine the maximum tolerated dose of LErafAON in combination with radiotherapy in patients with advanced malignancies (ClinicalTrials.gov).
- Study to determine the maximum tolerated dose of LErafAON in patients with advanced solid tumors.

Los llamados pequeños ácidos ribonucleicos de interferencia o siARN, descubiertos por Fire y Mello en 1998 y objeto del Premio Nóbel de Medicina y Fisiología de 2006, constituyen la herramienta más útil para silenciar la expresión de un gen y sus aplicaciones terapéuticas han despertado un enorme interés en los últimos años. Estos compuestos son ácidos nucleicos de doble cadena con 21 a 23 nucleótidos capaces de ensamblarse intracelularmente con un complejo multiproteico que posee una actividad que desune las dos cadenas de moléculas ARN y otra que hidroliza la cadena homóloga de m-ARN objetivo. Uno de estos siARN es el llamado siARN-027 que actúa frente al receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por lo que corta la activación de la angiogénesis patológica iniciada por el factor de crecimiento.

Recientemente se ha desarrollado una formulación del mencionado siARN el cual se derivatiza inicialmente con hexilamina y posteriormente se une covalentemente con succinimidil 3 (2 piridilditio) propionato (SPDP), utilizado como agente de reticulación, y metoxipolietilenglicol (5000 Da) con grupo sul-

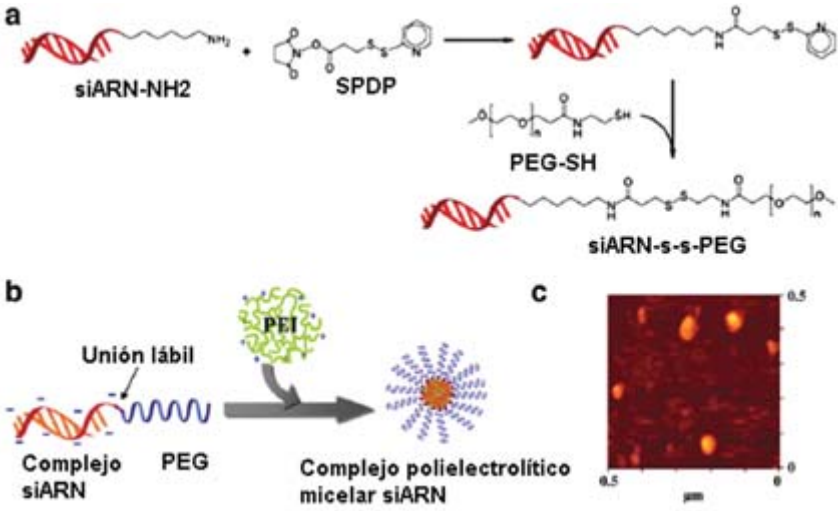


FIGURA 8.30. *Preparación del complejo polielectrolítico micelar siARN.*

fidrilo, formándose el complejo siARN-s-s-PEG cuyo carácter aniónico permite la condensación con polietilenimina ramificada (PEI) (25.000 Da) para dar lugar espontáneamente, en medio acuoso, a la formación de un complejo micelar polielectrolítico (50-80 nm). Este complejo, con las cadenas de PEG al exterior, se mantiene estable en plasma, pero intracelularmente se libera siARN por la acción del glutation (Figura 8.30).

El estudio de la biodistribución se realizó con ratones a los que se les había inyectado subcutáneamente células de carcinoma humano de próstata; tras haber alcanzado el tumor un tamaño de 50 mm^2 se administraron por vía i.v. siARN, siARN-PEI y siARN-PEG-PEI. Las imágenes de fluorescencia de la zona tumoral subcutánea (Figura 8.31) muestran una mayor acumulación cuando se utiliza el complejo micelar.

Según los expertos deberán pasar al menos cinco años para que podamos beneficiarnos de los primeros tratamientos basados en el siARN ya que todavía deben soslayarse algunas dificultades como el desarrollo de formas farmacéuticas de aplicación sistémica que aseguren el transporte y la liberación del agente terapéutico en el lugar de acción. Existen varias compañías trabajando en las aplicaciones terapéuticas de los siARN como Alnylam Therapeutics y Sirna Therapeutics y la firma holandesa Synvolux Therapeutics comercializa un vehículo (SAINT-RED) constituido por un tensoactivo catiónico (cloruro de 1 metil 4 (cis 9 dioleil) metilpiridinio) y DOPE al cual se incorporan los siARN.

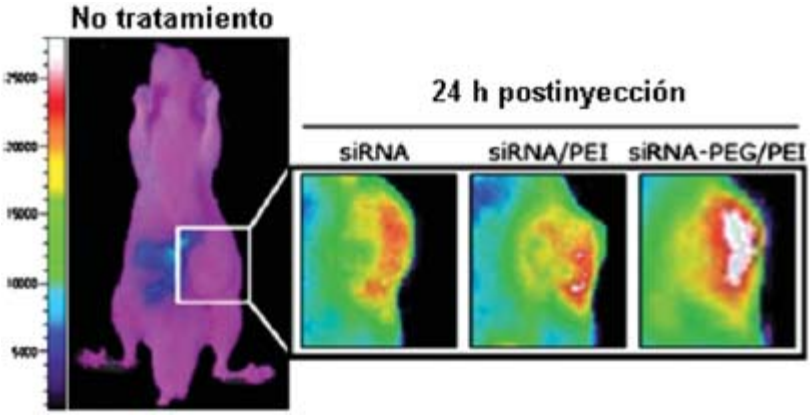


Figura 8.31. *Biodistribución del complejo micelar polielectrolítico siARN-PEG/PEI.*

Recientemente se ha propuesto como vehículo unas nanopartículas (de 100 a 300 nm) cuyo núcleo esta constituido por fosfato cálcico (en forma de hidroxiapatita), que fija el siARN y un polímero poliaspártico mientras que en la superficie se sitúan cadenas de PEG. El agente terapéutico es liberado de forma selectiva en el citoplasma celular debido a que la concentración de calcio en este compartimento es 20.000 veces menor que en el fluido extracelular (Figura 8.32).

Igualmente se han descrito otros sistemas como por ejemplo liposomas catiónicos de DOTAP-DOPE, nanopartículas de gelatina catiónica, quitosano y del

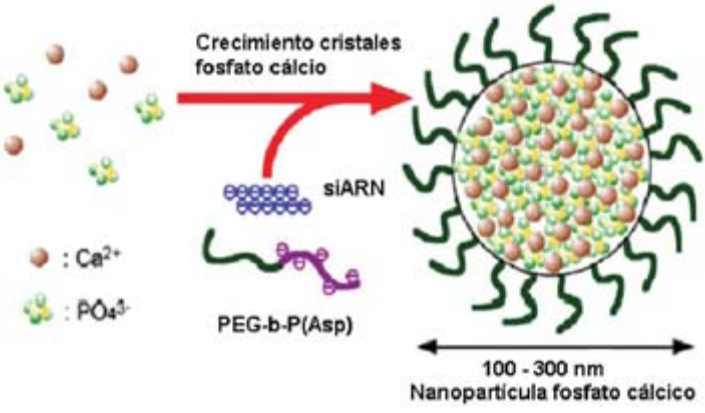


Figura 8.32. *Inclusión de siARN en nanopartículas de fosfato cálcico.*

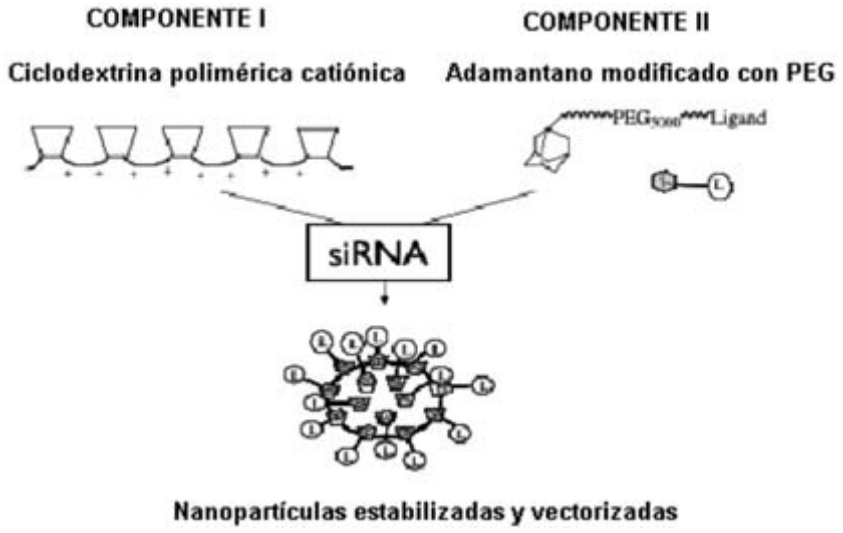


FIGURA 8.33. *Esquema de la tecnología utilizada por Calando Pharmaceuticals para la preparación de nanopartículas de siARN.*

copolímero polietilenimina-PEG. En todos estos casos los trabajos se han realizado para poner de manifiesto la actividad de las moléculas de siARN tanto *in vitro* como en animales de experimentación pero no se han iniciado ensayos clínicos con estos polímeros.

En septiembre de 2007 se ha publicado en la revista Proc. Nat. Acad. Sci. un trabajo en el que se hace un estudio de la biodistribución y captación de nanopartículas de unos 50 nm conteniendo siARN y transferrina. El impacto de este trabajo ha llevado a que la empresa Calando Pharmaceuticals anunciase en octubre del mismo año que inciaba un ensayo clínico en Fase I (CALAA01) utilizando su tecnología (Figura 8.33) consistente en nanopartículas de una ciclodextrina polímérica cationica la cual fija el siARN y adamantano; este último fija cadenas de PEG que sirven para estabilizar las nanopartículas y para introducir ligandos como la transferrina. Actualmente se encuentra en fase clínica I el siguiente ensayo:

- Safety study of CALAA-01 to treat solid tumor cancers (ClinicalTrials.gov).

El desarrollo de la terapia génica ha abierto las puertas para la utilización de material genético (ADN o ARN) en el tratamiento del cáncer bien porque el material genético es conducido específicamente a las células tumorales o el vec-

tor transporta el material a diversos tipos de células pero está sujeto al control de elementos promotores o amplificadores que dan lugar a que solo actúe sobre las células diana.

Entre los plásmidos incluidos en vectores no víricos destaca la Allovectin-7® que contiene la secuencia de ADN que codifica la cadena pesada HLA-B7 y α2 microglobulina que juntos constituyen el antígeno MHC-I. El plásmido se compleja con dos lípidos catiónicos: 1,2 dimiristoiloxipropil-3-dimetilhidroxietil amonio bromuro (DMRIE) y dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) y se inyecta bien intratumoral o intralesional. Los ensayos clínicos realizados con éste plásmido son los siguientes:

- A phase 3 pivotal trial comparing Allovectin-7® alone vs chemotherapy alone in patients with stage 3 or stage 4 melanoma
- Phase II trial of Allovectin-7® for metastatic melanoma.
- Phase II trial of Allovectin-7® for head and neck cancer.
- Chemotherapy with or without immunotherapy in treating patients with stage III or stage IV melanoma.
- Gene Therapy in treating patients with stage III or stage IV melanoma.

El fármaco está constituido por dos viales: uno contiene 0,4 mg de plásmido en 400 □L de suero Ringer Lactado y el otro contiene un liofilizado con 77 □g de DMRIE y 90 □g de DOPE. Este vial se reconstituye, con agitación, con 400 mL de suero Ringer Lactado que se adicionan al vial conteniendo el plásmido.

Los vehículos que hemos considerado hasta el momento constituyen los denominados vectores no víricos pero la inmensa mayoría (más del 80%) de los ensayos clínicos que se están realizando en terapia génica utilizan virus genéticamente modificados como vectores de material genético debido a su elevada eficiencia en la incorporación del material genético a la célula diana y la posterior producción de la proteína deseada.

La compañia china de biotecnología Sibiono ha comercializado en el año 2004 la especialidad farmacéutica Gendicine que está constituida por el gen supresor tumoral p 53 (llamado guardián del genoma celular por las múltiples funciones que desarrolla) incluido en un adenovirus serotipo 5 recombinante que ha sido modificado genéticamente para que no pueda reproducirse a sí mismo.

Desde que en 1993 se comenzó a conocer el papel que juega el gen p53 se han multiplicado las investigaciones con la intención final de encontrar las ade-

cuadas aplicaciones terapéuticas. Actualmente se sabe que el gen p53 activa a otros 6 genes diferentes y a uno de ellos con gran intensidad produciendo la llamada proteína matadora/dr5 la cual hace que se desencadene una cascada de enzimas cuya actuación provoca que las células cancerosas se destruyan o se suiciden.

Esta especialidad farmacéutica constituye la primera en ser aprobada por una agencia sanitaria con la indicación de tratamiento del carcinoma nasofaríngeo en combinación con radioterapia. Aunque ésta es la indicación aprobada, sin embargo se están realizando diversos ensayos clínicos en 20 tipos de cáncer como pulmón, hígado, mama, etc., bien en forma aislada o asociada a radioterapia, quimioterapia o cirugía y que han sido objeto de diversas publicaciones durante el año 2007.

La compañía Introgen Therapeutics está realizando ensayos clínicos en Fase III con Advexin® que es un adenovirus que expresa el gen p53; los ensayos más avanzados se realizan en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello así como en el Síndrome de Li-Fraumeni, enfermedad hereditaria debida a una deficiencia del tumor supresor p53 lo que da lugar a la aparición expontánea de tumores ampliamente distribuidos; la revisión de los datos ha sido solicitada a la EMEA en noviembre de 2007 para obtener la aprobación en ésta indicación. Otros ensayos clínicos se están realizando en cáncer de mama (en asociación con docetaxel y doxorubicina), pulmón y próstata.

La misma compañía está desarrollando, en fase preclínica, una formulación de p53 incluida en nanopartículas con una cubierta de DOPE y colesterol (INGN 402) y otra conteniendo interleukina 24 (INGN 403).

De forma análoga la compañía Ark Therapeutics ha estudiado el fármaco Cerepro®, para el tratamiento del glioma de alto grado, constituido por un adenovirus que transportaba un gen timidín kinasa procedente del virus herpes simple. El preparado, en forma de solución debe inyectarse en la cavidad cerebral resultante de la intervención quirúrgica seguido, a los cinco días, de un tratamiento con ganciclovir sódico. En julio de 2007 la compañía retiró la solicitud de examen ante la EMEA pero en diciembre 2008 ha presentado nuevamente la solicitud de autorización de comercialización.

En los últimos años se está prestando gran atención a la posibilidad de obtener virus sintéticos con los que obtener sistemas que posean simultáneamente las ventajas de los vectores virales y una mayor flexibilidad y ausencia de inmunogenicidad, características de los vectores no virales.

Desde hace algunos años se vienen utilizando liposomas, denominados virosomas, que contienen proteínas virales en su membrana con objeto de mejo-

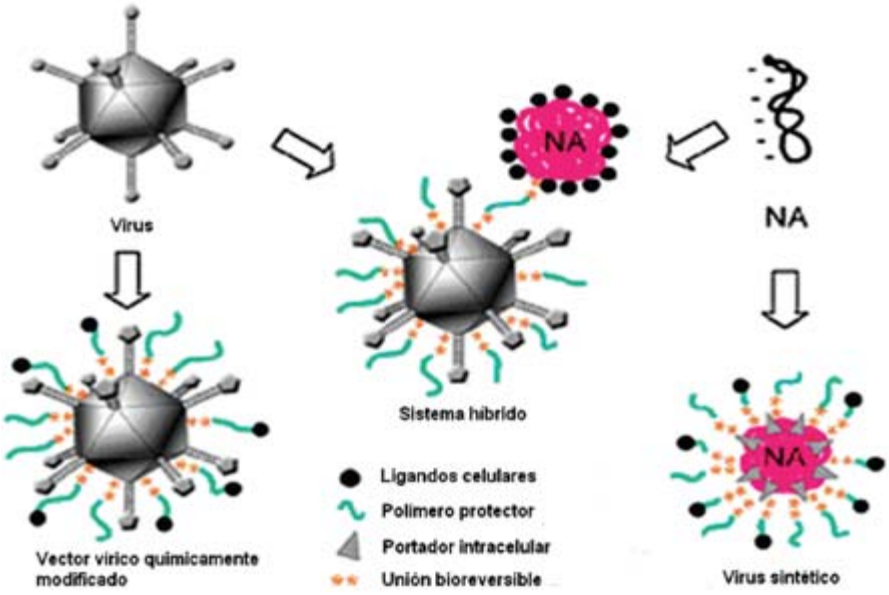


Figura 8.34. *Combinación de modificaciones químicas y genéticas de virus recombinantes o virus sintéticos.*

rar la presentación de antígenos específicos a las células inmunes y en el momento actual ya están comercializadas diversas vacunas preparadas con ésta tecnología.

El recubrimiento de adenovirus con polímeros hidrofílicos como PEG o N-2-hidroxipropilmetacrilamida impide que el virus interaccione con sus receptores, neutralizar antígenos o bien conseguir una reorientación del vector (vector vírico químicamente modificado de la Figura 8.34). Un ejemplo de este sistema consiste en introducir genéticamente restos de cisteína cuyos grupos tiol son altamente reactivos para ligandos proteicos como la transferrina. Igualmente adenovirus pegilados con cadenas de PEG de 2.000 Da han sido reorientados con anticuerpos anti E selectina hacia células endoteliales vasculares en piel inflamada.

Otra estrategia es obtener vectores híbridos combinando elementos víricos y no víricos (Figura 8.34 centro). Por ejemplo partículas de adenovirus pueden ser fijadas covalentemente a una formulación no vírica como puede ser la condensación de un ácido nucleico (NA) con un polímero catiónico. El genoma del vector vírico puede ser regulado por el casette de expresión genética no vírico, favoreciendo una reorientación o el vector vírico puede aumentar la eficiencia intracelular del vector no vírico. Otro tipo de estrategia híbrida incorpora la to-

talidad del genoma vírico en una formulación no vírica; así, por ejemplo, se ha integrado en liposomas, a base de DOPE, DOTAP y colesterol, un plásmido de replicación condicionada del adenovirus oncolítico dl1520. La eficacia antitumoral, tanto por administración local como intravenosa, ha sido demostrada mediante xenografías en ratas infectadas con células tumorales humanas pero, a diferencia del virus oncolítico, la actividad sistémica se mantuvo incluso en presencia de anticuerpos neutralizantes.

Finalmente es posible la obtención de los llamados virus sintéticos (Figura 8.34 derecha) que contienen un ligando para realizar la vectorización y un péptido que induce la liberación del principio activo del endosoma. Así por ejemplo, se ha descrito la preparación de un sistema conteniendo ARN condensado con polietilenimina, factor de crecimiento epidérmico unido a través de cadenas de PEG y melitina como péptido que favorece la liberación en el endosoma. En experiencias, tanto en cultivos celulares de glioblastoma (en las que hay una sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico) como en ratas, el sistema ha demostrado su alta capacidad para destruir las células tumorales.

Regulon ha desarrollado una tecnología mediante la cual se incluye en liposomas catiónicos el alfa virus semliki forest, genéticamente modificado, para que produzca la interleukina 12 (LipoVIL 12) con objeto de conseguir una inmunoterapia basada en una estimulación de los linfocitos T y/o de las células NK. Actualmente se encuentran en fase clínica I/II diversos ensayos en tumores de próstata, gliomas, etc.

La firma Introgen Therapeutics está desarrollando vectores nanoparticulares constituidos por DNA condensado y rodeado por una cubierta lipídica a base de DOTAP y colesterol. En el momento actual se encuentra en Fase Clínica I nanopartículas conteniendo el supresor tumoral FUS 1 (ClinicalTrials.gov):

- Phase I study of IV DOTAP: cholesterol-Fus 1 in non-small-cell lung cancer.

En fase preclínica se encuentran formulaciones conteniendo la proteína p53 (el ya mencionado INGN 402) y el supresor tumoral interleukina 24.

NANOTECNOLOGÍA Y AGENTES DE CONTRASTE

Uno de los problemas clave en el tratamiento del cáncer es la detección temprana del mismo ya que, a menudo, se detecta en sus fases más posteriores, cuando ya ha comprometido a uno o más sistemas vitales del órgano y se ha

extendido a través del cuerpo. En el Cancer Nanotechnoly Plan se establece que uno de los objetivos es disponer de agentes de contraste capaces de detectar 100.000 células tumorales y por ello los métodos de diagnóstico temprano del cáncer son de suma importancia y constituyen un área activa de investigación ya que el diagnóstico y el estadío exacto son clave para el diseño de un plan de tratamiento.

Los óxidos de hierro coloidales como la magnetita son superparamgnéticos y su efecto se evidencia como un contraste negativo en las imágenes de resonancia magnética. Cuando estas partículas de óxidos de hierro se estabilizan con polímeros como dextrano, almidón o polietilenglicoles se impide su agregación en medios fisiológicos siendo captados por el sistema mononuclear fagocitario y constituyen buenos elementos de contraste para metástasis en hígado y bazo, formando los primeros óxidos de hierro superparamagnéticos (SPIO en la terminología anglosajona).

Si los óxidos de hierro son incluidos en nanopartículas de dextrano, con un tamaño de partícula de 50 nanometros, es posible obtener sistemas estables, no reconocibles por el sistema mononuclear fagocitario, con un tiempo largo de permanencia y se utilizan para estudios de angiogénesis tumoral y detección de tumores cerebrales.

Finalmente una tercera generación de estos sistemas consiste en el empleo de nanopartículas que llevan en su superficie anticuerpos monoclonales específicos y que actualmente se encuentra en fase de experimentación en animales.

Los liposomas también pueden utilizarse como vehículos conteniendo diversos agentes de contraste que pueden incorporarse bien en la fase interna acuosa o en la bicapa lipídica, pudiéndose utilizar fundamentalmente dos procedimientos para gamma escintigrafia o RMN. En el primer caso el metal es unido a un quelante hidrosoluble, como por ejemplo dietilentriamina pentaacetato (DTPA). En el segundo caso se puede derivatizar DTPA y obtener los llamados quelantes membranotrópicos como por ejemplo DTPA-estearilamina (DTPA-SA) o DTPA-fosfatidiletanolamina (DTPA-PE) en cuyo caso el átomo paramagnético va en la parte polar del agente quelante mientras que la parte apolar se introduce en la bicapa del liposoma. Como átomos se usan In 111; Tc 99. Mn o Gd.

Los complejos Gd-DTPA-PE y In111-DTPA-SA han servido para la preparación de micelas cuya parte polar es PEG 5000 Da. Estas micelas PEG-lípido presentan un tamaño de partícula muy pequeño por lo que poseen un buen grado de penetración intratumoral. Los liposomas pegilados conteniendo In 111 han

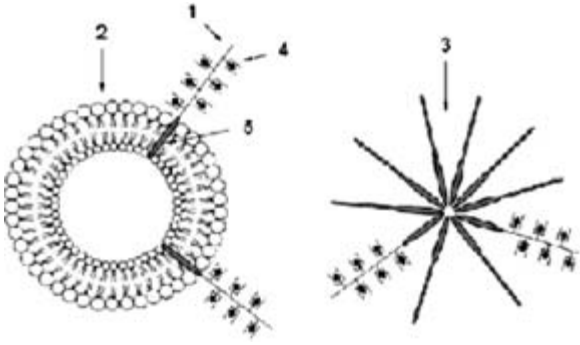


FIGURA 8.35. *Incorporación de polímeros anfifílicos poliquelantes (1) a la membrana de liposomas (2) o núcleo de la micela (3). Cada cadena poliquelante (4) contiene átomos como In 111, Tc 99 para gammaescintigrafia o Gd, Fe, Mn para RMN y la porción hidrofóbica (5) fija el polímero al nanosistema.*

sido estudiados para ver la localización y evolución de diferentes tratamientos en pacientes con varios tipos de cáncer habiéndose encontrado una mejor visualización en 15 de los 17 pacientes tratados.

Para incrementar la carga del agente de contraste se ha propuesto la utilización de los llamados polímeros anfifílicos poliquelantes (PAP) constituidos por una cadena polimérica conteniendo numerosos grupos quelantes y un grupo terminal hidrófobo que sirve para la fijación del polímero a dominios hidrofóbicos de liposomas o micelas (Figura 8.35). En el caso de la RMN los átomo metálicos estan directamente expuestos a la fase acuosa tisular lo que incrementa la relajación de los iones paramagnéticos y un incremento de la visualización.

Un ejemplo interesante de la aplicación de estos sistemas conteniendo polímeros anfifílicos quelantes es el de liposomas conteniendo iones paramagnéticos como agentes de contraste MRN de tejidos ricos en macrófagos como por ejemplo los órganos del sistema retículo endotelial. Igualmente liposomas o micelas cargados con radioisótopos se muestran como vehículos muy adecuados para la visualización de nódulos linfáticos regionales.

El agente de contraste Tc 99- MIBI (6 metoxi isobutil isonitrilo) ha sido incorporado a liposomas pegilados e inyectados a ratas. Una hora después de la inyección se encuentra una actividad 10 veces mayor en sangre que cuando se usa el contraste libre; por otra parte se produce una mayor acumulación en tejido tumoral (línea celular MCF7-ras implantada en ratas).

Basándose en el hecho que los receptores del péptido vasoactivo intestinal se encuentra sobreexpresado unas 5 veces más en el cáncer de mama se han pre-

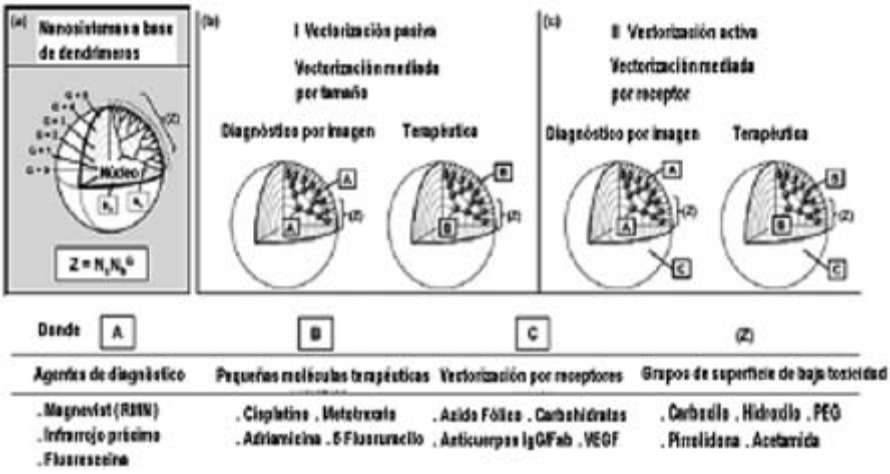


Figura 8.36. *Esquema de las posibilidades de los dendrímeros como sistemas multifuncionales.*

parado liposomas pegilados a los cuales se les incorpora, en su superficie, un neuropéptido de 28 aminoácidos así como el complejo Tc99-HMPAO (hexametilpropilenamina oxima) observándose un marcado efecto acumulativo en el tumor de mama el cual no se debe solo a un efecto EPR sino también a una vectorización activa producida por el neuropéptido.

Los dendrímeros constituyen un reciente grupo de polímeros que han llamado poderosamente la atención como moléculas portadoras no solo de fármacos sino también de agentes de contraste constituyendo unos excelentes ejemplos de multuifuncionalidad ya que, como se recoge en la Figura 8.36, pueden llevar contrastes como magnevist, trazadores de fluorescencia o contrastes para el infrarrojo próximo; pueden llevar agentes citostáticos como cisplatino, metotrexato o 5 fluoruracilo, ligandos de vectorización y grupos que disminuyen la toxicidad.

Entre los dendrímeros estudiados para su posible uso en clínica destaca el dendri-PAMAM(CO(2)Na) (64) que pertenece a una generación 4,5 y con un tamaño 5 nm de diámetro. Recientemente ha sido ampliamente estudiado *in vitro* por el Nanotechnology Characterization Laboratory (perteneciente al National Cancer Institute USA) conluyéndose que presenta una excelente biocompatibilidad, excreción renal y no es inmunogénico.

La introducción de nanosistemas de segunda generación (estéricamente estabilizados) y la posibilidad de una vectorización pasiva hacia células tumora-

les han permitido la utilización clínica de algunos de ellos; sin embargo ello constituye un éxito parcial porque no todos los citostáticos difunden eficientemente en la masa tumoral haciendo difícil un control de la cantidad de fármaco que llega a las células diana ya que si es insuficiente puede traducirse en la aparición de un efecto de resistencia múltiple a fármacos.

Para un futuro inmediato es necesario superar estas limitaciones utilizando nanosistemas de tercera generación que se fijen activamente sobre células específicas después de su extravasción. Ello implica la fijación de ligandos a la superficie del nanovehículo los cuales reconocen y se fijan a células diana a través de interacciones ligando-receptor siendo necesario que el ligando se una con una elevada selectividad a receptores situados a nivel de la célula diana. Por otra parte, es necesario que la sobreexpresión de receptores sea superior a valores críticos; por ejemplo la eficiente liberación de liposomas a receptores de células B, utilizando el anticuerpo monoclonal anti CD19, requiere que la densidad de receptores esté en el rango de 10.000 a 100.000 por célula y en el caso de modelos de cáncer de mama se necesita una densidad de 1.000 receptores ErbB2 para obtener una mayor respuesta terapéutica con liposomas de doxorubicina conteniendo ligandos anti-ErbB2.

La unión de ciertos ligandos a sus correspondientes receptores puede dar lugar a una endocitosis mediada por receptor que es necesaria si el fármaco debe liberarse en el interior de la célula. Por el contrario, la vcectorización de nanovehículos a receptores no internalizantes, puede ser ventajosa en tumores sólidos debido a que la falta de receptores libres en la célula tumoral permite su destrucción al liberarse el principio activo en su superficie.

En general se admite que una elevada afinidad aumenta la eficacia de la vectorización; sin embargo, para tumores solidos, existen evidencias de que una elevada afinidad puede disminuir la difusión del nanovehículo en la masa tumoral.

La finalidad de una terapéutica oncológica es incrementar el tiempo de supervivencia y la calidad de vida del paciente y los nanosistemas ofrecen las mejores oportunidades terapéuticas en base a lograr una especificidad y eficiente liberación del fármaco y la posibilidad de prevenir la resistencia múltiple a fármacos. Aunque aun estamos lejos de alcanzar la « bala mágica « preconizada por P. Ehrlich se cree que pronto se entrará en una era en la que los nanosistemas representarán una importante modalidad terapéutica y diagnóstica en oncología.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Nanoparticles for pharmaceutical applications (2007) Domb A.J.; Tabata Y.; Ravi Kumar M. N.V. y Farber S. Ed.: American Scientific Publishers. Los Angeles.

(2) Cancer Nanotechnology Plan: A strategic initiative to transform clinical oncology and basic research through the direct application of Nanotechnology (2004) U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. Health National Cancer Institute.

(3) European Technology Platform: Nanomedicine. Cordis.europe. eu/nanotechnology/nanomedicine.htm.

(4) Eurpean Medicines Agency. (2006) Reflection paper on nanotechology-based medicinal products for human use.

(5) Clinical Trial.gov.

(6) Uchegbu, I.F. (2006) Pharmaceutical nanotechnology: polymeric vesicles for drug and gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv*. 3 (5): 629-640.

(7) Zamboni, W.C. (2005) Liposomal, nanoparticles and conjugatd formulations of anticancer agents. *Clin. Cancer Res*. 11 (23): 8230-8234.

(8) Torchilin, V.P. (2007) Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives: *Pharm. Res*. 24 (1): 1-16.

(9) Hatakeyama, H., Akita, H., Kogure, K., Oishi, M., Nagasaki, Y., Kihira, Y., Ueno, M., Kobayashi, H., Kikuchi, H. & Harashima, H. (2007) Development of a novel system gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Gene Therapy.* 14: 68-77.

(10) Yih, T.C. & Al-Fandi, M. (2006) Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J. Cell. Biochem*. 97: 1184-1190.

(11) Cheng, J., Teply, B.A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F.X., Levy-Nissenbaum, E., Radovis-Moreno, A.F., Langer, R. & Farokhzad, O.C. (2007) Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*. 28: 869-876.

(12) Xion, X.B., Huang, Y., Lu, W.L., Zhang, X., Nagai, T. & Zhang, G. (2005) Intracelular delivery of doxorubicine with RGD modified sterically stabilized liposomes for an improved antitumor efficacy in vitro and in vivo. *J. Pharm. Sci*. 4: 1782-1793.

(13) Farokhzad, O.C. & Langer, R. (2006) Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv. Drug Del. Rev*. 58: 1456-1459.

(14) Nishiyama, N. & Kataoka, K. (2006) Current state, achievements and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol. & Therapeutics*. 112: 630-648.

(15) Kabanov, A.V. (2006) Polymer genomics: An insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. *Adv. Drug Del. Rev*. 58: 1597-1621.

(16) Akhtar, S. & Benter, I. (2007) Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: Potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 59: 165-182.

(17) Couvreur, P. & Vauthier, C. (2006) Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res*. 23: 1417-1450.

(18) van Vlerken, L.E., Vyas, T.K. & Amiji, M.M. (2007) Poly (ethylene glycol)-mofied nanocarriers for tumor targeted and intracelular delivery. *Pharm. Res*. 24 (8): 1405-1414.

(19) Torchilin, V.P. (2006) Multifuncional nanocarriers. *Adv. Drug Delivery Rev*. 58: 1532-1555.

(20) Vasir, J.K., Reddy, M.K. & Labhasetward. (2005) Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges. *Current Nanoscience*. 1: 47-64.

(21) Torchilin, V.P. (2007) Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal*. 9 (2): E 128-E 147.

(22) Bartlett, D.W., Su, H., Hildebrandt, I.H., Weber, W.A. & Davis, M.E (2007) Impact of tumor specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 104: 15549-15554.

(23) Zhang, L., Gu, F.X., Chan, J.M., Wang, A.Z., Langer, R.S. & Farokhzad, O.C. (2007) Nanoparticles in Medicine: Therapeutics appllications and developments. *Clinical Pharmacology&Therapeutics*: on line publication 24 de Octubre.

(24) Haley, B. & Frenkel, E. (2008) Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment: Urologic Oncology. *Seminars and Original Investigation*. 26: 57-64.

(25) Satchi-Fainaro, R., Puder, M., Davies, J.W., Tran, H.T., Sampson, D.A., Greene, A.K., Corfas, G. & Folkman, J. (2004) Targeting angiogenesis with a conjugate of HPMA copolymer and TNP-470. *Nature Medicine*. 10: 255-261.

(26) Dragovich, T., Mendelson, D., Kurtin, S., Richardson, K., Von Hoff, D. & Hoos, A. (2006) A phase II trial of the liposomal DACH platinum L-NDDP in patients with therapy-refractory advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol*. 58: 759-764.

(27) Rini, B.I., Selk, L.M. & Vogelzang, N.J. (1999) Phase I study of direct intralesional gene transfer of HLA-B7 into metastatic renal carcinoma lesions. *Clinical Cancer Res*. 5: 2766-2772.

(28) Heath, J.R. & Davis, M.E. (2008) Nanotechnology and Cancer. *The Annual Review of Medicine*. 59: 251-265.

(29) Sofou, S. (2007) Surface-active liposomes for targeted cancer therapy. *Nanomedicine*. 2 (5): 711-724.

(30) Li, Ch. & Wallace, S. (2008) Polymer-drug conjugates: Recent development in clinical oncology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60: 886-898.

(31) Kogure, K., Akita, H., Yamada, Y. & Hirashima, H. (2008) Multifuncional envelope-type nano device (MEND) as a non-vral gene delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60: 559-571.

(32) Romberg, B., Hennink, W.E. & Storm, G. (2008) Shedable coatings for long-circulating nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 25: 55-71.

(33) Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O., Margalit, R. & Loanger, R. (2007) Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology.* 2: 751-760.

(34) Kim, S.H., Jeong, J.H., Lee, S.H., Kim, S.W. & Park, T.G. (2008) Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. *Journal of Controlled Release*. 129: 107-116.

(35) Byme, J.D., Betancourt, T. & Brannon-Peppas, L. (2008) Active targeting schemes for nanoparticle systems in cnacer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 1615-1626.

(36) Lee, E.S., Kim, D., Youn, Y.S., Oh, K.I. & Bae, Y.H. (2008) A novel virus-mimetic nanogel Vehicle. *Angew. Chem. Int. Ed*. 47: 2418-2421.

9. Nanovacunas

SARA VICENTE, ALEJANDRO SÁNCHEZ Y
MARÍA JOSÉ ALONSO

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

BREVE HISTORIA SOBRE LA VACUNACIÓN

La vacunación es una de las intervenciones médicas más efectivas y seguras actualmente. Desde su descubrimiento, las vacunas son el mejor medio para prevenir enfermedades, y se considera que han llegado a ser el mayor logro en salud pública de todos los tiempos junto con los antibióticos y las mejoras de higiene en la población, contribuyendo enormemente a la reducción de la morbilidad y mortalidad debida a enfermedades infecciosas.

FIGURA 9.1. *Lámina que ilustra el inicio de la vacunación frente a la viruela por Jenner en el siglo XVIII.*

La viruela ha sido la primera enfermedad infecciosa que se ha tratado de prevenir hace ya más de mil años en la Antigua China. Entre otros métodos, se utilizaban las costras y/o secreciones desecadas y convertidas en polvo de un paciente con viruela para inmunizar contra la enfermedad. Se administraba insuflando el polvo en las fosas nasales con la finalidad de crear inmunidad tras repetidas exposiciones, de forma absolutamente intuitiva.

La primera evidencia científica en el intento de proteger a la población frente a la viruela aparece a finales del siglo XVIII gracias a Edward Jenner. Éste había observado como las lecheras que previamente habían contraído la viruela bovina, no llegaban a desarrollar la variante humana de la enfermedad. Inoculando las costras tomadas de las vacas infectadas y previamente procesadas, administraba los microorganismos *atenuados*, es decir, la variante menos virulenta de la enfermedad. Y aunque nunca obtuvo la vacuna de forma experimental, fue el primero en utilizar el concepto de atenuación para conseguir vacunas frente a un patógeno, muy diferente a la utilizada más adelante por Louis Pasteur.

Pasteur redefine el término *atenuación* referido a vacunas, ya que a diferencia de Jenner, él utilizaba el mismo agente causal de la enfermedad para generar la vacuna. Hace este descubrimiento de forma casual cuando se olvida un cultivo de *Pasteurella multocida* (agente causal del cólera del pollo) y observa que al inocularlo a los pollos, éstos se protegían frente a la enfermedad. Del mismo modo, continuó aplicando el mismo concepto a otras vacunas frente al ántrax o la rabia. Las técnicas de atenuación basadas en los descubrimientos de Pasteur han ido mejorando con el tiempo de forma que se han ido obteniendo vacunas cada vez más puras, debido a los grandes avances en cuanto a cultivos celulares que permitieron el mejor aislamiento y cultivo del patógeno causante de la enfermedad, y la posterior atenuación del mismo usando diferente métodos, de forma que se logra menguar la actividad del microorganismo manteniendo su inmunogenicidad.

La carrera por profundizar en la investigación de nuevas vacunas y nuevas formas de inmunización más seguras y eficaces comienza ya en el momento en el que se describen los múltiples riesgos asociados a la inmunización con patógenos vivos atenuados (reactivación del microorganismo, reacciones anafilácticas, etc.). Así, ya en la segunda mitad del siglo XIX, se establece en Estados Unidos el concepto de vacuna compuesta por el microorganismo completamente desactivado ó muerto. Edmun Salmon y Theobald Smith, desarrollaron la primera vacuna desactivada con calor contra el cólera del cerdo, y a partir de ahí se generaron de este modo una lista de vacunas desactivadas hasta nuestros días, entre las que se encuentra por ejemplo las vacunas contra el cólera humano y la peste.

A principios del siglo XX se descubre la inmunogenicidad provocada por las toxinas generadas por las bacterias de la difteria y el tétanos químicamente inactivadas, es decir, aparecen los primeros toxoides. A partir de este descubrimiento se comienza la búsqueda de subunidades de organismos patógenos que pudiesen generar inmunogenicidad sin tener que administrar el microorganismo completo al paciente.

Es entre los años 70 y 80 cuando tiene lugar la aparición de las primeras vacunas formadas por las subunidades más inmunogénicas y conservadas del patógeno, como fracciones polisacarídicas o proteínas purificadas. La primera vacuna de este tipo, contra *Haemophylus influenzae* tipo b, compuesta por un conjugado de proteína y un polisacárido de la cápside del virus, fue aprobada en 1985 (1).

Paralelamente a estos importantes avances, comienza el gran desarrollo de las nuevas técnicas de ingeniería genética. Se comienza a investigar en profundidad para identificar y aislar los componentes más inmunogénicos y conservados de los microorganismos, así como el desarrollo de nuevas técnicas la atenuación racional mediante mutación directa del genoma de patógenos, eliminando las fracciones más virulentas y generando microorganismos apatógenos. Es así como en 1986, Merck comercializa la primera vacuna recombinante de la hepatitis B, obtenida en cultivos de levaduras mediante la técnica de ADN recombinante.

Por otro lado, la técnica del ADN recombinante ha servido para diseñar plásmidos ADN que contengan una secuencia codificadora de un antígeno para lograr respuestas inmunológicas, como recientemente ha sido recogido en la revisión de Liu y col. (2). El mecanismo de presentación del antígeno en este caso, imitaría a la forma natural de presentación de los antígenos víricos. De igual forma que si se consigue la liberación del plásmido vacuna en el interior de la célula, el virus internaliza en la célula su material genético, que se traduce a las proteínas virícas gracias a la maquinaria celular. Estos antígenos serían procesados y presentados luego por las células presentadoras de antígeno (CPA) por el mismo mecanismo que los antígenos víricos.

La secuenciación del genoma de los diferentes patógenos también ha contribuido de forma importante a la identificación de nuevos antígenos y factores de protección, a lo que se denomina vacunología reversa (3).

Como vemos, desde los descubrimientos de Pasteur en cuanto a la atenuación de microorganismos para generar protección inmunológica frente a enfermedades infecciosas, el desarrollo de vacunas hasta nuestros días se ha basado en mejorar su perfil de seguridad mediante (a) la purificación exhaustiva de vacunas

atenuadas o desactivadas para minimizar reacciones adversas asociadas, (b) mejorando las técnicas de atenuación mediante mutaciones racionales para evitar reactivación de los microorganismos atenuados administrados y mediante (c) la búsqueda y expresión de nuevos antígenos subunidad, así como el diseño de plásmidos mediante las técnicas más avanzadas de ingeniería genética. Siempre se ha tratado de mejorar el perfil de seguridad de las vacunas para evitar los riesgos asociados a la inmunización, pero al mismo tiempo se trata también de conseguir que la inmunogenicidad de estas nuevas vacunas sea la adecuada para dar lugar a vacunas eficaces que protejan a la mayoría de la población. Asimismo, se están haciendo grandes avances para lograr que la respuesta inmune generada sea la adecuada en función del patógeno contra el que se está protegiendo y de las nuevas aplicaciones de las vacunas para el tratamiento de enfermedades infecciosas crónicas y del cáncer, denominadas vacunas terapéuticas (4). Existe cada vez más la necesidad de modular la respuesta inmune en función de este objetivo final, de forma que se están investigando nuevos adyuvantes y sistemas de liberación de vacunas para intentar polarizar, en este caso, la respuesta inmune hacia la generación de respuestas celulares específicas frente a patógenos intracelulares o marcadores antigénicos específicos de células tumorales.

Por ello sería importante durante el diseño de una nueva vacuna, tener en mente una serie de aspectos básicos, de forma que aplicando dichos conocimientos se llegue a una vacuna final que cumpla los requisitos de seguridad y eficacia así como para enfocarla a su aplicación final. Según describe Bramwell y col. (5) el diseño de una vacuna se basaría fundamentalmente en tres puntos:

- Identificación y producción de antígenos recombinantes o material genético que presenten buenas características para generar respuestas inmunes específicas frente a la infección en cuestión.
- Conocer el comportamiento del agente patógeno cuando entra en contacto con el organismo y los consecuentes procesos que darán lugar a la generación de la respuesta inmune, de forma que se pudiese imitar dicho comportamiento para conseguir una respuesta inmunológica más adecuada a cada patógeno.
- Utilización de diferentes estrategias para aumentar y modular la respuesta inmunológica de forma que se debe tener un amplio conocimiento de los mecanismos de acción de los adyuvantes o sistemas de liberación.

Actualmente el enfoque en el desarrollo de nuevas vacunas se centra en incrementar su seguridad y aumentar la confianza de la población mediante la aplicación nuevas tecnologías que mejoren la administración de antígenos y la bús-

queda de nuevos marcadores antigénicos y adyuvantes adecuados para evitar las reacciones adversas derivadas de la inmunización, pero al mismo tiempo manteniendo la eficacia de protección conseguida con las vacunas clásicas. De este modo se pretende facilitar la administración de las vacunas con el fin de mejorar el cumplimiento en las pautas de inmunización y para que los calendarios y campañas de vacunación sean más sencillos. De modo que la mayor parte de la población se encuentre protegida y se llegue a controlar y minimizar la propagación de enfermedades infecciosas con el consecuente beneficio en la salud pública mundial (6).

NECESIDAD DE NUEVAS VACUNAS

En general, las vacunas disponibles en el mercado y que se están utilizando actualmente, presentan un perfil de seguridad envidiable, sobre todo teniendo en cuenta que cualquier intervención médica lleva siempre asociado un cierto riesgo. Sin embargo, las vacunas se administran normalmente a población sana, y en especial a niños, con lo cual cualquier posible reacción adversa que pueda asociarse a la inmunización va a tener un gran impacto (7). Actualmente, en términos globales, la población que se está protegiendo supera con creces a los casos esporádicos identificados de reacciones adversas. Es por ello que las vacunas continúan contribuyendo de forma crucial a la reducción de la morbilidad y la mortalidad debidas a enfermedades infecciosas.

La preocupación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) por la seguridad tanto en los calendarios de vacunación ya establecidos como en las campañas de vacunación ocasionales, ha derivado a que se lleven a cabo nuevas estrategias de control que aseguren la calidad del producto durante su fabricación y mejoren la vigilancia tras su comercialización para poder detectar posibles efectos adversos y así, poder actuar de forma rápida y eficaz frente a la posible aparición de reacciones adversas esporádicas. Del mismo modo, grandes esfuerzos se centran en promover y apoyar la investigación y el desarrollo de métodos de liberación y administración más eficientes mediante el uso de nuevas tecnologías (8). Existe por tanto, una gran necesidad de desarrollar nuevas vacunas que se acerquen cada vez al tópico de «vacuna ideal» (Tabla 9.1) con la finalidad última de aumentar la cobertura inmunológica de la población.

Se están invirtiendo grandes esfuerzos para conseguir este objetivo siguiendo diferentes vías. Por un lado, mediante la búsqueda e identificación de nuevos antígenos (3) o mediante el diseño de vacunas basadas en plásmidos ADN (9) capaces de generar respuestas inmunes específicas sin la nece-

TABLA 9.1. *Resumen de las características que reuniría una «vacuna ideal» y las consecuencias que supondría cada una de ellas para conseguir el objetivo final.*

Características de la vacuna	Implicaciones	Objetivo final
Segura	Evitar riesgos de contagio de patógenos transmitidos a través de fluidos biológicos. Disminución de la carga de deshechos derivados de la inmunización.	
Efectiva	Minimizar la variabilidad paciente-paciente. Conseguir nivel máximo de protección.	Ampliar la cobertura inmunológica en la población
Tecnología sencilla	Más barata y más rápida de producir.	
Fácil administración	Evitar la presencia de personal sanitario especializado para la administración. Posibilidad de vacunaciones masivas en casos de epidemia/pandemia.	
Barata	Fácilmente adquirible cualquier país del mundo.	
Termoestable	Evita la pérdida de efectividad por variaciones de temperatura.	
De fácil aceptación por el paciente, cómoda y bien tolerada	Mejora en el cumplimiento de las pautas de inmunización. Vacunación más efectiva.	
Disminución del número de dosis administradas: vacunas de dosis única o vacunas múltiples.	Mejora en el cumplimiento de las pautas de inmunización. Vacunación más efectiva.	
Evitar la necesidad de personal cualificado para la administración.	Economiza las campañas de vacunación. Posibilidad de vacunas auto-administradas por el paciente.	

sidad de administrar el microorganismo atenuado. Y por otro lado, para mejorar la cobertura inmunológica, también se pueden realizar importantes mejoras en la propia formulación de las vacunas ya existentes pero que todavía resultan poco eficaces frente a la enfermedad que se quiere proteger. Por tanto, se trata de encontrar el modo de optimizar y modular la respuesta inmune alcanzada en función del patógeno diana y su aplicación final, de modo que la formulación sea la más adecuada en caso de tratarse de una vacuna preventiva o terapéutica.

MEJORAR EL ACCESO A VACUNAS EN LA POBLACIÓN

Es igualmente de enorme importancia, mejorar el acceso a las vacunas en la población global con el fin de aumentar la cobertura inmunológica frente a enfermedades infecciosas. En general, el acceso a vacunas en países industrializados no es un problema, sin embargo, en el caso de países en vías de desarrollo existe una gran problemática relacionada con la baja accesibilidad de la población general a las campañas de vacunación debido a la falta de financiación, deficiencias en las infraestructuras de inmunización y barreras logísticas en la distribución a áreas remotas, principalmente (10). Los pilares básicos para comenzar a solventar la problemática relacionada con el acceso a la vacunación en países pobres y también para poder aumentar la confianza en la vacunación de la población de los países industrializados se resumen en: (a) conseguir una liberación del antígeno más fácil y segura mediante su administración a través de vías no invasivas que no requieran inyección, (b) disminución de la dependencia de la cadena de frío con vacunas termoestables, (c) minimizar el número de intervenciones con vacunas de dosificación única o vacunas múltiples.

Utilización no segura de agujas necesarias para la administración parenteral de vacunas

El simple hecho de inmunizar está generando al mismo tiempo un aumento del riesgo en la transmisión de patógenos como el VIH o el VHB, los cuales se transmiten a través de fluidos biológicos (11). Es especialmente significativo en países en vías de desarrollo, el uso no seguro del material de inmunización (agujas y jeringas) debido principalmente a su reutilización y al manejo en condiciones no estériles de los viales multidosis conteniendo la vacuna. Este es un importante foco de contagio de enfermedades transmitidas a través de fluidos biológicos, dando lugar a un aumento del riesgo de transmisión tanto del paciente como del personal sanitario, al mismo tiempo que se favorece la propagación de este tipo de enfermedades infecciosas durante el proceso de inmunización (12). Por otro lado, se generan residuos peligrosos derivados del uso de agujas y jeringas para la administración que no siempre son adecuadamente tratados y eliminados (13). Sería por tanto muy interesante el desarrollo de nuevas tecnologías mediante el diseño de sistemas de liberación de vacunas sin agujas para mejorar la seguridad durante la inmunización, disminuir la problemática derivada de los deshechos asociados, al mismo tiempo que se mejoraría la aceptación por parte del paciente y se reducirían los costes ligados a la vacunación al utilizar tecnologías y modos de administración más sencillos (14).

Termoestabilidad

A pesar de la concienciación de la necesidad de mantener la cadena de frío es muy frecuente que se produzcan deficiencias relacionadas principalmente con la exposición temporal a altas temperaturas durante el transporte o almacenamiento, o por congelación, debido a un exceso de refrigeración (15). Son especialmente sensibles aquellas vacunas cuyo adyuvante es el álum (16), ya que su estructura particulada se destruye tras la congelación. La pérdida de potencia de las vacunas es la consecuencia fundamental de una deficiencia en la cadena de frío que frecuentemente puede pasar inadvertida. De esta forma, los pacientes que reciban estas vacunas, probablemente no se estarán protegiendo adecuadamente. Por lo tanto, mejorando la estabilidad de las vacunas a diferentes temperaturas para evitar la cadena de frío, se garantizará el acceso a vacunas en estado óptimo especialmente en áreas remotas en países del tercer mundo donde es habitual la falta de electricidad y por tanto, difícil mantener la refrigeración (17).

Dosificación múltiple

La mayoría de las vacunas, y especialmente los nuevos antígenos recombinantes, necesitan de varias dosis de recuerdo para poder alcanzar un nivel de protección adecuado. Junto con esto, la necesidad de administrar un alto número de vacunas para proteger frente a una gran variedad de patógenos, son las principales razones por las que solo mediante la vacunación se administren un altísimo número de dosis mediante inyección (14). En general, debido a esto, las pautas de inmunización no siempre se cumplen, de forma que pacientes que no reciben la dosificación correcta no llegan a generar una protección adecuada, y estarían igualmente expuestos a infecciones. Alternativas para solventar esta limitación se relacionan principalmente con la posibilidad de administrar vacunas que requieran de una única dosis, capaz de alcanzar los niveles de protección sin recurrir a las dosis de recuerdo, o mediante la vacunación múltiple, es decir, administrar varios tipos de antígenos para proteger frente a varias enfermedades en una sola vacuna (18).

Por tanto, para evitar la problemática relacionada con la vacunación actual y aumentar la cobertura inmunológica de la población, se debe tratar de investigar nuevas alternativas mediante la introducción de nuevas tecnologías que permitan realizar campañas de inmunización más seguras y al mismo tiempo aumenten la confianza de la población en la vacunación, fundamentalmente (12).

Nuevas formulaciones de vacunas basadas en el uso de inmunomoduladores y potenciadores de la respuesta inmune

Las vacunas clásicas basadas en microorganismos atenuados o muertos han sido utilizadas desde los tiempos de Jenner hasta nuestros días. Sin embargo, ya se ha visto que éstas pueden ir acompañadas de cierta problemática relacionada con la posible reactivación del agente infeccioso como consecuencia de mutaciones en el genoma, así como la presencia de agentes tóxicos que pueden acompañar al patógeno, como son los lipopolisacáridos (LPS) o por la pérdida de potencia debido a deficiencias en el transporte y almacenamiento en las condiciones refrigeración requeridas. Sin embargo, la mayor purificación de las vacunas que se ha conseguido en los últimos años gracias a los importantes avances en el campo de la biotecnología que permite la obtención de antígenos recombinantes, o plásmidos ADN codificadores de antígenos, aumentan de forma importante la seguridad de las vacunas, pero a cambio, la mejora en la seguridad también suele conllevar una disminución en la inmunogenicidad de la vacuna.

La menor potencia de la respuesta inmune lograda tanto con los antígenos recombinantes como con las vacunas ADN hace que sea necesario, en general, el apoyo con algún tipo de adyuvante, de forma que ayude a incrementar la respuesta inmunitaria sobre el antígeno/material genético administrado, especialmente si se pretende desarrollar un sistema de vacunación a través de una vía mucosa.

Actualmente existen una amplia variedad de adyuvantes en estudio como son los toxoides bacterianos, las emulsiones, sustancias inmunoestimulantes, y cada vez más, los sistemas de liberación de antígenos se consideran sistemas adyuvantes (19, 20). Sin embargo el más ampliamente utilizado y todavía el único aprobado para su uso en la elaboración de vacunas en Estados Unidos, son las sales insolubles de aluminio, más conocidas como álum (21). Hasta el momento, el álum ha demostrado que puede ayudar a generar respuestas inmunológicas importantes al administrarse con el antígeno por vía parenteral, y al mismo tiempo es considerado un adyuvante aceptablemente seguro desde el momento de su descubrimiento, en los años 20. A pesar de ello, el álum presenta ciertos inconvenientes relacionados principalmente con la aparición de síntomas locales tras la inyección, como hinchazón, eritemas o nódulos cutáneos, que pueden durar incluso varias semanas. Básicamente se manejan dos hipótesis a la hora de explicar la sintomatología producida por el álum, y es que puede actuar como reservorio del antígeno o formar un foco inflamatorio de atrac-

ción de células inmunocompetentes como consecuencia del efecto depot o como característica propia del compuesto (22). Por otro lado, otra importante desventaja de este adyuvante se relaciona con su inestabilidad tras la congelación debido a la destrucción del gel a 0 ºC provocando una disminución en la potencia de la vacuna (16). La respuesta inmunológica alcanzada con este adyuvante presenta un perfil bastante limitado al estimular la producción de citoquinas que favorecen principalmente la proliferación de linfocitos Th2 y la inducción de una respuesta humoral. Otra limitación de este adyuvante tiene que ver con la generación de IgE, inmunoglobulina que media en las respuestas alérgicas (22).

Sin embargo, a pesar de que el álum es el único adyuvante aprobado para su en humanos, actualmente se están invirtiendo grandes esfuerzos en la búsqueda de nuevos adyuvantes más eficaces y seguros, es decir, adyuvantes que permitan modular la respuesta inmune en función de las características del patógeno y que al mismo tiempo presente un perfil de seguridad mejor que el álum. Por ejemplo, recientemente ha sido introducido en el mercado europeo un nuevo adyuvante, consistente en un sistema de liberación particulado, la microemulsión MF59™. En 1997 se aprobó en Italia para ser utilizado conjuntamente con la vacuna de la gripe (Fluad™), y posteriormente se ha ido introduciendo en el resto de países de la Unión Europea por reconocimiento mutuo, debido a sus buenas características de seguridad y eficacia demostradas a lo largo de estos años en distintos estudios clínicos (23).

INTRODUCCIÓN DE LAS NANOTECNOLOGÍAS EN EL DESARROLLO DE VACUNAS

En los últimos años, el desarrollo de sistemas de liberación de vacunas ha sido ampliamente investigado. Liposomas, micropartículas, emulsiones y más recientemente nanopartículas, han sido objeto de investigación como sistemas de liberación de vacunas que podrían mejorar la inmunogenicidad de los nuevos antígenos recombinantes y además permitirían la administración a través de vías no invasivas, como la vía mucosa o la liberación transdérmica, ayudando a mejorar la cobertura inmunológica (24, 25).

En general, los sistemas de liberación consisten en sistemas particulados que promueven la captación del antígeno por las células presentadoras de antígeno (CPA) favoreciendo su reconocimiento para que de este modo, el antígeno sea liberado al sistema inmune de una forma más eficiente (20). Al mismo tiempo se puede aumentar la inmunogenicidad del antígeno asociado mediante la incorporación de algún tipo de adyuvante para ser liberado simultáneamente,

bien para aumentar su potencia, o bien para modular la respuesta inmune y dar lugar a respuestas celulares si se trata de una vacuna frente a patógenos víricos intracelulares o vacunas terapéuticas (26).

Ya a finales de los años 70, los sistemas poliméricos basados en microsferas comienzan a utilizarse como potenciales sistemas de liberación y transportadores de antígenos, con la finalidad de obtener un sistema de vacunación adecuado para la inmunización en dosis única (27). El importante desarrollo en la utilización de microsferas poliméricas biodegradables a partir de ese momento se debió en gran medida al interés mostrado por la industria química y farmacéutica en estos sistemas. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) proponía las microsferas de PLGA como una forma para mejorar la cobertura inmunológica, así como para reducir los costes asociados a la vacunación (28). A partir de ese momento, la utilización de microsferas elaboradas a partir de este biomaterial ha sido ampliamente estudiado para la liberación de vacunas y contribuir a la inducción de la respuesta inmune específica frente al antígeno asociado a través de diferentes vías de administración (29-34).

Ya más recientemente, el uso de las nanopartículas poliméricas para la liberación de vacunas ha comenzado a destacar como una posible estrategia para desarrollar nuevas vacunas (35). Las buenas características de estos nuevos sistemas de liberación poliméricos serán descritos en los siguientes apartados.

Nanopartículas poliméricas para la liberación de vacunas

Las nanopartículas son estructuras de tamaño nanométrico formadas a partir de diversos materiales capaces de asociar una molécula bioactiva. Una importante característica de estos sistemas es su mayor capacidad de captación por las células comparado con estructuras de mayor tamaño.

Existen una amplia variedad de nanosistemas diferenciados por los materiales utilizados para su elaboración y/o método de preparación, de forma que, de forma resumida, pueden distinguirse en nanosferas, nanocápsulas, liposomas, micelas poliméricas y dendrímeros (41). Dichos sistemas presentan propiedades que pueden ser empleadas para mejorar la liberación de fármacos, proteínas, genes y vacunas (Tabla 9.2).

Son especialmente interesantes aquellos nanosistemas cuya composición se basa en biomateriales o biopolímeros. La elaboración de nanopartículas a partir de este tipo de materiales garantiza el que se pueda llegar a desarrollar un vehículo biodegradable, biocompatible y potencialmente seguro para su administra-

TABLA 9.2. *Resumen de las diversas aplicaciones de los distintos tipos de sistemas coloidales para la liberación de vacunas.*

Nanosistema	Descripción	Aplicaciones recientes/Referencia
Dendrímeros	Compuesto macromolecular ramificado creado a partir de un núcleo interno.	Dirigidos a los receptores de manosa de las células M al unir un ligando específico (36).
Liposomas	Vesículas artificiales formadas a partir de fosfolípidos y colesterol.	Liposomas catiónicos como sistema adyuvante de vacunas para la malaria (37).
Nanocapsulas	Sistemas vesiculares rodeados por una cubierta polimérica.	Nanoemulsión recubierta de quitosano para inmunización nasal (38).
Micelas poliméricas	Compuestas por polímeros anfifílicos que se asocian en solución acuosa.	Micelas capaces de liberar fármacos de forma selectiva en compartimentos intracelulares (39).
Nanosferas	Sistemas matriciales en los que el fármaco se encuentra uniformemente disperso.	Liberación de plásmidos DNA codificadores de antígeno por vía nasal con NP de PLGA-Poloxamer (40).

ción en humanos. Las nanopartículas poliméricas diseñadas para la liberación de vacunas pueden actuar mediante un mecanismo depot, según el cual el antígeno asociado se va liberando gradualmente de manera sostenida. Además, este tipo de sistemas coloidales ofrecen grandes ventajas para la liberación de vacunas a través de las barreras mucosas, especialmente por la vía oral y nasal, siendo capaces de dar lugar a una respuesta inmunológica sistémica, pero al mismo tiempo a nivel de la mucosa, debido a la importante presencia del sistema inmune en los tejidos asociados a las mucosas (MALT) (42), como por ejemplo, las placas de Peyer a nivel intestinal y el NALT a nivel de las vías respiratorias. Por un lado, las nanopartículas protegen al antígeno encapsulado frente a la degradación enzimática, especialmente tras su administración oral, y por otro lado, pueden promover la captación por la células M del NALT y de las placas de Peyer (43).

El diseño de vehículos nanométricos basados en biomateriales puede ser una solución muy adecuada para superar las barreras biológicas y la baja inmunogenicidad de muchos antígenos, de forma que puedan contribuir en la inducción de la respuesta inmune específica deseada, ofreciendo al mismo tiempo importantes ventajas para aumentar la cobertura inmunológica. Por un lado, debido a sus propiedades para superar barreras biológicas, las nanopartículas poliméricas podrían contribuir enormemente en el diseño de un sistema de vacunación que evite las rutas de administración invasivas (35, 44, 45). Por otro lado, se podría mejorar de forma más efectiva la respuesta inmune en función de la

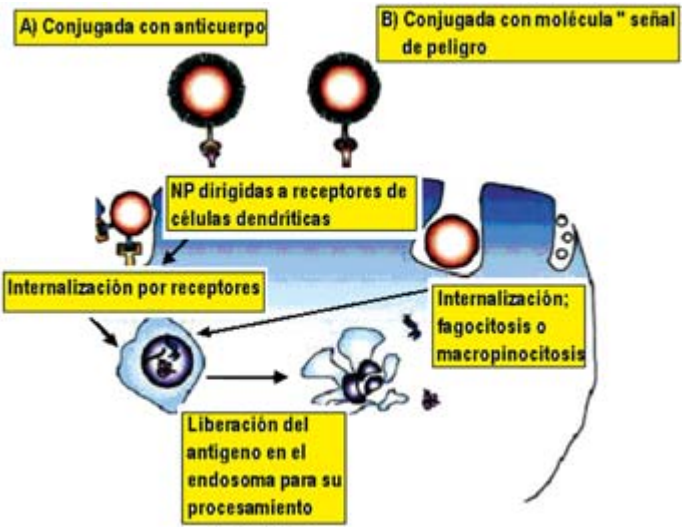


FIGURA 9.2. *Mecanismos de captación de nanopartículas por las células presentadoras de antígenos.*

aplicación final de la vacuna, mediante la modificación de los distintos mecanismos de activación del sistema inmune innato, como el aumento en la captación o la activación directa de las CPA.

Para ello, diversos mecanismos de activación del sistema inmune innato a través de las CPA (p. ej. las células dendríticas), juegan un papel relevante a la hora de generar una respuesta inmune específica (46). Por tanto, mediante el diseño de un sistema coloidal polimérico se podrían intentar modular dichos mecanismos para conseguir una respuesta adecuada, como se resume a continuación:

La forma en que el antígeno es internalizado y luego liberado intracelularmente es un factor clave para que se llegue a generar una respuesta inmunitaria de células T, como se puede apreciar en la Figura 9.2. Por tanto, al aumentar la internalización y posterior liberación intracelular del antígeno con un sistema nanoparticulado, cabría esperar una mejora en el tipo de respuesta inmune generada.

Algunos biomateriales pueden incluso tener actividad adyuvante por si mismos y actuar como «señales de peligro» para activar los receptores TLR («Toll-like receptors») de las CPA, como por ejemplo los polifosfacenos (47) con lo cual un sistema de liberación de vacunas compuesto por este tipo de biomateriales, podría activar directamente estas células e inducir inmunidad de células T.

Finalmente, mediante la modulación del tamaño de partícula, se puede acceder directamente a las células dendríticas de los ganglios linfáticos en lugar de ser previamente captadas y procesadas por las células dendríticas periféricas. De este modo, la respuesta inmune se generaría directamente en los órganos inductores (48).

El uso de nanopartículas poliméricas para la liberación de vacunas ha sido cada vez mayor en los últimos años. La importancia de estos nuevos vehículos para mejorar la inmunización se ve reflejada en el gran número de sistemas con diversas propiedades que han ido surgiendo, elaborados utilizando una amplia gama de biomateriales y técnicas de preparación, e ideados con la finalidad de generar un vehículo de tamaño nanométrico capaz de acercar más fácil y eficazmente el antígeno al sistema inmune, al mismo tiempo que pudiese llegar a regular la respuesta inmunológica inducida (19, 25, 35, 43, 44).

Interacción de las nanopartículas poliméricas con el sistema inmune - captación por las células presentadoras de antígeno

Las células dendríticas son unas potentes células presentadoras de antígeno que se encuentran en tejidos periféricos y órganos linfoides. Son capaces de activar a las células B y T e iniciar una respuesta inmune específica. El papel de las células dendríticas inmaduras que se encuentran en los tejidos periféricos es la de reconocer sustancias extrañas y patógenos. Presentan una alta capacidad para captar antígenos y procesarlos mediante la expresión abundante de los complejos mayores de histocompatibilidad tipo I y II (MHC I y II), moléculas coestimuladoras (p. ej. CD80, CD86, CD40) y la secreción de otras moléculas accesorias necesarias, como citoquinas (p. ej. IL-12), quemoquinas (p. ej. CCL19 y CCL22) y la expresión de receptores de citoquinas (p. ej. CCR7), para una eficaz presentación del antígeno (49).

En el caso de los sistemas de liberación de vacunas, es especialmente interesante la capacidad de las nanopartículas poliméricas para ser más eficazmente captadas e internalizadas por las CPA células dendríticas debido a su tamaño nanométrico (50).

Los antígenos particulados, y en concreto los sistemas coloidales poliméricos transportadores de antígeno, pueden ser captados por las células dendríticas a través de diversos mecanismos de endocitosis (51): mediada por receptores (liberación selectiva), macropinocitosis (antígenos solubles), mediada por clatrina o caveolina, y fagocitosis. El que una nanopartícula polimérica se internalice de una u otra manera depende de forma importante de su tamaño, forma, carga y composi-

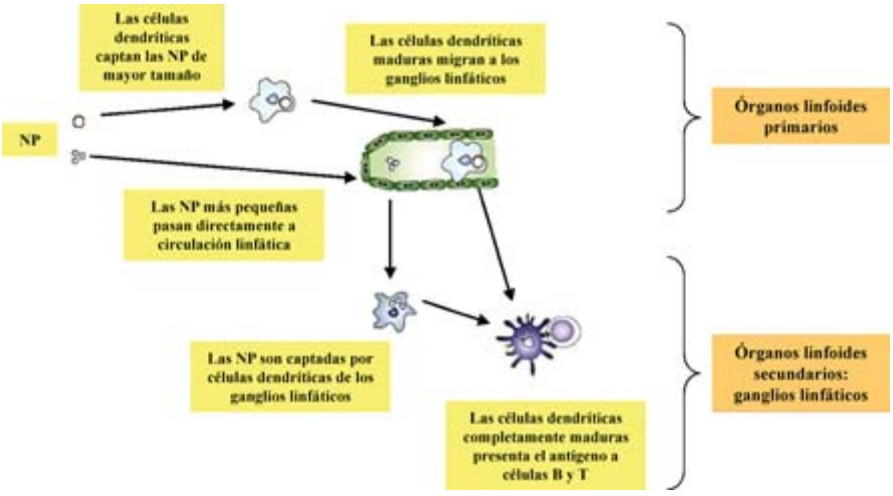


FIGURA 9.3. *Captación y procesamiento por la CPA del antígeno transportado por nanopartículas para generar una respuesta inmunológica específica en los ganglios linfáticos.*

ción superficial. Una vez internalizada, se incluye en el compartimento endocítico para que el antígeno sea procesado en unidades peptídicas y posteriormente presentado en los MHC clase II a las células T $CD4^+$ en los órganos linfoides secundarios (Figura 9.3). De esta forma se inicia la inducción de una respuesta inmune específica frente al antígeno presentado. Alternativamente, puede producirse una presentación cruzada del antígeno exógeno mediante el uso de sistemas de liberación particulados a través de MHC clase I. Siguiendo esta ruta de procesamiento el antígeno es presentado a células T $CD8^+$ para finalmente conseguir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) (52). Para el desarrollo de vacunas frente a patógenos intracelulares y vacunas terapéuticas este tipo de respuesta celular es especialmente interesante, ya que las CTL son capaces de eliminar patógenos intracelulares y células malignas o apoptóticas.

Aunque una amplia variedad de biomateriales han sido utilizados para el desarrollo de nanopartículas para liberación de vacunas, más recientemente han sido estudiados los sistemas de nanopartículas elaboradas a partir de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) (53), gelatina (54), ácido poli-Á-glutámico (55), dendrímeros (36) o protamina (56) para aumentar la captación de antígenos y sustancias inmunoestimulantes por las células dendríticas.

Las nanopartículas de PLGA han sido estudiadas ampliamente como sistemas de liberación de fármacos, proteínas y material genético (50). Sin embargo re-

cientes estudios han demostrado que las nanopartículas de PLGA pueden ser un excelente vehículo para ser captado eficazmente por las células dendríticas. Nanopartículas de PLGA con un tamaño medio de 300 nm (57) son captadas por estas células de forma importante mediante fagocitosis. Al igual que otros sistemas basados en gelatina (58) o poli-Á-glutámico modificado (59) de similar tamaño de partícula (300 nm y 250 nm respectivamente), la mayor captación de los sistemas coloidales por parte de las células dendríticas se manifiesta en su posterior activación y maduración mediante el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y MHC clase II en la superficie celular (51).

La incorporación de una sustancia inmunoestimulante en un sistema coloidal puede ver incrementada su propia capacidad estimuladora al ser reconocida y captada por las células dendríticas en un sistema particulado. Por ejemplo, la encapsulación de MPLA (derivado no tóxico del LPS) en nanopartículas de PLGA provocan una maduración de las células dendríticas mayor que el inmunoestimulante en solución. Por otro lado, estudios similares llevados a cabo con nanopartículas de gelatina y gelatina cationizada elaboradas mediante desolvatación (54), han demostrado incrementar la capacidad inmunoestimuladora del CpG ODN, un oligonucléotido capaz de estimular a las células dendríticas debido a su interacción con el receptor TLR4. De este modo se corrobora la eficacia de estos nanosistemas para ser internalizados por las células dendríticas mejorando el efecto estimulante del CpG ODN. Se aprecia además, cómo diferencias en las propiedades superficiales del sistema afectan a la internalización y maduración de las células dendríticas tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que las nanopartículas elaboradas a partir de gelatina cationizada, y por tanto con un potencial ˙ positivo, han resultado ser más eficazmente captadas que las nanopartículas neutras.

Estudios realizados con nanopartículas de poli-Á-glutámico modificado con aminoácidos hidrofóbicos que dan un carácter anfifílico al polímero, han demostrado que la sola presencia del sistema en el medio contribuye enormemente a la activación de las células dendríticas (55), es decir, la mayor captación del antígeno, en este caso ovalbúmina, y posterior maduración de las células tiene lugar independientemente de que éste se encuentre encapsulado en las nanopartículas o como una mezcla física. Sin embargo, solamente las células dendríticas activadas con las nanopartículas cargadas con el antígeno han sido capaces de estimular una respuesta de células T específica, lo cual se ha atribuido a que la prolongación de la vida media del antígeno encapsulado en el interior celular podría ser un factor determinante en la generación de una respuesta inmune celular.

Así mismo, se ha determinado que las células dendríticas activadas por nanopartículas de PLGA presentan un importante potencial para activar a las células T (53), y por tanto, para inducir una respuesta inmune celular CTL debido a una mayor secreción de citoquinas tipo Th1. Esta característica puede ser especialmente beneficiosa para el desarrollo de una vacuna terapéutica dirigida a la inmunoterapia del cáncer o de enfermedades infecciosas crónicas.

En general, independientemente de los diferentes tipos de biomateriales utilizados, estos vehículos de tamaño nanométrico han sido capaces de interaccionar de forma importante con las células dendríticas, de forma que son eficazmente internalizadas dando lugar a su activación, pudiendo incluso incrementar la actividad adyuvante de la sustancia inmunoestimulante asociada. Ello indica que la presentación del antígeno a las células dendríticas en forma particulada con sistemas coloidales mejora notablemente su captación, provocando consecuentemente la maduración de la célula dendrítica y la migración a los órganos linfoides secundarios para poder iniciar una respuesta inmunológica específica. Por tanto, la liberación intracelular del antígeno a las células dendríticas es un factor especialmente importante a la hora de optimizar la respuesta inmune, siendo los sistemas de nanopartículas poliméricas una estrategia muy adecuada para conseguir este objetivo, que por otro lado, permitiría dirigir el antígeno hacia determinadas rutas de procesamiento intracelular llegando incluso a modular la respuesta inmune (60).

APLICACIÓN DE LAS NANOVACUNAS A LA INMUNIZACIÓN POR VÍAS MUCOSAS

El gran éxito alcanzado con la vacunación oral frente a la poliomielitis, utilizando una vacuna basada en el microorganismo atenuado, ha llevado a considerar la vacunación a través de las vías mucosas una posible alternativa para desarrollar sistemas de liberación sin agujas. Las posibles consecuencias de implementar un sistema de este tipo serían, entre otras, la posibilidad de mejorar la cobertura inmunológica global e incrementar el perfil de seguridad de las vacunas al evitar el uso de agujas y jeringas. Igualmente importante, al introducir una forma de vacunación que no requiere inyección, se mejora la aceptación por parte del paciente, incrementado su confianza en las campañas y calendarios de vacunación de forma que se podría mejorar el cumplimiento en las pautas de inmunización (61).

Los antígenos administrados en las vacunas para inmunización están compuestos principalmente por proteínas propias del patógeno, o por plásmidos ADN codificadores de proteínas antigénicas, como se ha descrito previamente. Sin em-

bargo, debido a la baja estabilidad de estas biomoléculas, especialmente en zonas de alto contenido enzimático como el sistema digestivo, su administración se ve restringida a las vías parenterales (subcutánea e intramuscular), para evitar su posible degradación previa al efecto terapéutico. Además, al tratarse principalmente de moléculas de elevado peso molecular y carácter hidrofílico, presentan una limitada capacidad para ser transportadas a través de las barreras biológicas.

Uno de los principales objetivos en el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en sistemas coloidales a base de biomateriales, ha sido el de mejorar la estabilidad de macromoléculas terapéuticas (péptidos, proteínas o material genético) en los medios biológicos, así como para mejorar su transporte a través de las barreras biológicas que imponen las diferentes vías de administración no parenterales.

Principalmente, el tamaño nanométrico de estos sistemas favorece enormemente su capacidad para superar las barreras biológicas y transportar la molécula bioactiva hacia el tejido diana donde llevará a cabo su acción farmacológica. Sin embargo, no solo el tamaño de partícula es un factor relevante a la hora de diseñar un nanovehículo para el transporte de macromoléculas a través de vías no invasivas, sino que otras propiedades como la bioadhesividad, la estabilidad en medios biológicos, su composición y propiedades superficiales, influyen de forma crucial en el éxito del nanosistema para superar las barreras biológicas de las superficies mucosas y hacer llegar la molécula terapéutica a su diana (62).

Una amplia variedad de nanosistemas elaborados a partir de diversos biomateriales, tanto de carácter hidrofóbico (PLGA, PLA, PECL) como hidrófilo (quitosano, ácido hialurónico, alginato, glucomanano) han sido utilizados como vehículos de macromoléculas terapéuticas a través de diferentes vías mucosas (63). Sin embargo, aquellos sistemas basados en polímeros hidrofílicos de origen natural, como por ejemplo el quitosano (64, 65), han sido ampliamente estudiados como sistemas de liberación a través de las vías mucosas, debido a que permiten la encapsulación de macromoléculas terapéuticas mediante técnicas más sencillas y en condiciones no agresivas que no requieren del uso de solventes orgánicos ni de la aplicación de elevada energía (p. ej. sonicación, ultrasonidos, etc.), y debido a su aceptable estabilidad en fluidos biológicos y mayor afinidad por las superficies mucosas (62).

La vacunación a través de las vías mucosas ha atraído gran interés en los últimos años debido además a la posibilidad generar una respuesta inmune específica a nivel de la superficie mucosa. Esta característica es de especial interés de-

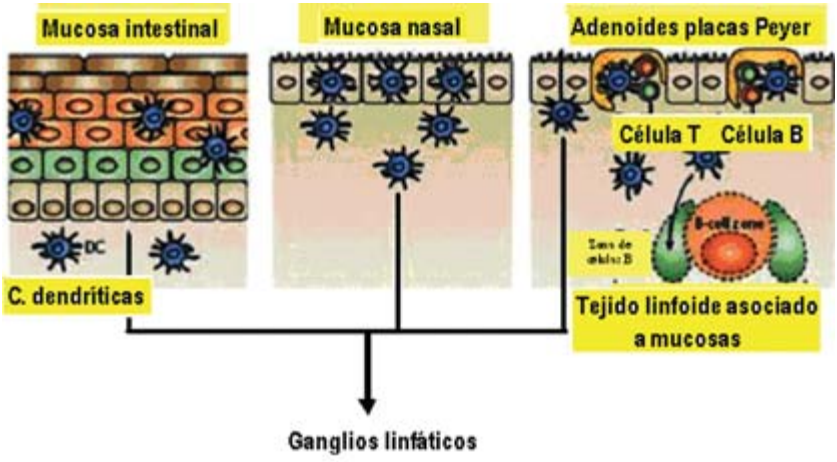


FIGURA 9.4. *Representación esquemática de la presencia del sistema inmune en las diferentes superficies mucosas.*

bido fundamentalmente a la gran ventaja que ofrece frente a la inmunización parenteral a la hora de generar protección frente a patógenos que accedan al organismo utilizando esta vía de entrada, ya que con la administración parenteral del antígeno no se llega a conseguir este tipo de respuesta a nivel de las mucosas (66).

Las superficies mucosas son altamente ricas en tejidos linfoides asociados a mucosa (MALT), además de contar con la importante presencia de CPA en la zona submucosa como se puede apreciar en la Figura 9.4. De esta forma, cualquier antígeno liberado y captado por las CPA del MALT y la submucosa, sería capaz de iniciar una respuesta inmune específica tanto a nivel de la mucosa, mediante la secreción de IgA, como a nivel sistémico, con la aparición de IgG en sangre (42). Con lo cual, en primer lugar se crearía una barrera defensiva en dicha zona para minimizar la entrada de microorganismos, al tiempo que se podría llegar inducir una respuesta inmune sistémica duradera.

Por tanto, la elección de un sistema coloidal para mejorar el transporte de antígenos a través de las superficies mucosas para llegar a los tejidos donde se encuentran las CPA puede ser una buena alternativa a la liberación mediante inyección y para conseguir respuestas inmunitarias a nivel de la mucosa.

En general, la vía oral y la vía nasal son las más comúnmente aceptadas para la liberación de vacunas a través de mucosas debido a su buena aceptación por parte de los pacientes y a sus características favorables para la liberación de antígenos.

ADMINISTRACIÓN DE NANOVACUNAS POR VÍA ORAL

La captación de fármacos y antígenos transportados en sistemas de liberación particulados en el tracto gastrointestinal puede producirse por diversos mecanismos: a través de las microvellosidades, los macrófagos intestinales, los propios enterocitos o el epitelio de las placas de Peyer, a través de las células M. Sin embargo, la mayoría de las evidencias indican que la absorción, tanto de micropartículas como nanopartículas, se produce principalmente a través de las placas de Peyer. Los principales parámetros que afectan a la captación de sistemas particulados a través del epitelio de las placas de Peyer son el tamaño de partícula, la dosis de partículas administrada, y las características superficiales del sistema como la hidrofobicidad, la carga superficial, y la adición de ligandos dirigidos específicamente hacia las células M (67). De esta forma, la modulación de estas características puede favorecer la captación de los sistemas desarrollados por las placas de Peyer.

A día de hoy, los sistemas mejor estudiados para la liberación de vacunas por vía oral han sido las micropartículas poliméricas, en concreto, las compuestas por PLA o PLGA. Es mucho menor la información que se maneja en cuanto al uso de nanopartículas poliméricas para inducir respuestas inmunológicas tras la administración oral (45). Sin embargo, trataremos de resumir las características de los sistemas nanoparticulados estudiados a día de hoy para la inmunización oral.

El hecho de que este tipo de sistemas interaccionen principalmente con los órganos linfoides asociados a la mucosa intestinal es una de las principales ventajas de la administración de vacunas a través de la vía oral, ya que el antígeno podrá ser liberado directamente al sistema inmune presente en la mucosa intestinal al mismo tiempo que se protege al antígeno frente a la degradación enzimática. Aparte, existen otras posibilidades como la liberación selectiva con ligandos dirigidos a las células M y la incorporación de sustancias adyuvantes para mejorar la respuesta inmune a través de esta vía. Sin embargo, en general, se necesita de una mayor dosis de antígeno para generar una respuesta humoral similar a la conseguida con dosis más bajas a través de otras vías como la nasal, utilizando el mismo vehículo, como se observa en el estudio realizado por Jung y col. (68) con nanopartículas de PLGA modificado con PVA (polivinilalcohol). En este mismo estudio se comprueba además, el efecto del tamaño de partícula tras la administración oral. Coincidiendo con las hipótesis de que el tamaño de partícula llevado al rango nanométrico mejora el paso a través de las barreras mucosas, las nanopartículas de menor tamaño, en este caso de 100 nm,

han sido mejor captadas en el tracto gastrointestinal que los prototipos de mayor tamaño (500 nm y > 1 m) y consecuentemente, la respuesta inmune alcanzada ha sido superior en el caso de las partículas de menor tamaño.

Una posible estrategia para optimizar la interacción de los sistemas coloidales con la mucosa gastrointestinal es mediante la incorporación de un ligando específico, que interaccione directamente con las células M de las placas de Peyer. Por ejemplo, nanopartículas de PLGA encapsulando el antígeno de superficie de la hepatitis B, han sido modificadas con lectina, un ligando específico de las células M. Mediante microscopía confocal, Gupta y col. (69) han demostrado la intensa interacción entre los nanosistemas y las células M, lo que se ve reflejado en una mayor respuesta inmune humoral frente a la hepatitis B cuando se compara con el mismo sistema de nanopartículas que no presenta el ligando específico.

Otra interesante estrategia para mejorar la respuesta inmune tras la inmunización oral ha sido la co-encapsulación del antígeno con un inmunoestimulante. En este caso, nanopartículas de quitosano recubiertas por alginato han demostrado su capacidad para ser captadas por las placas de Peyer sin mostrar signos de toxicidad (70) pudiendo ser *a priori* un buen sistema candidato para la inmunización oral. Sin embargo, ha sido necesaria la co-encapsulación del inmunoestimulador CpG ODN con el antígeno de superficie de la hepatitis B, para incrementar la respuesta inmune humoral y celular a través de esta vía (71). De hecho, se observa que es un factor fundamental el que se produzca una co-liberación simultánea del antígeno con el agente inmunoestimulante para mejorar la respuesta inmune, ya que la administración del CpG ODN en solución con las nanopartículas no es capaz de ejercer una acción inmunoestimuladora suficiente para mejorar la respuesta inmune.

Por lo tanto, la incorporación del antígeno a un sistema de nanopartículas poliméricas podría ser una estrategia adecuada para su liberación a nivel intestinal. Sin embargo, como hemos descrito en este apartado, todavía es necesario optimizar los sistemas desarrollados hasta ahora para conseguir un óptimo candidato para la liberación de vacunas a través de la vía oral.

ADMINISTRACIÓN DE NANOVACUNAS POR VÍA NASAL

Entre las diferentes posibilidades para la vacunación a través de las superficies mucosas, además de la inmunización oral descrita previamente, la vía nasal es sin duda la opción más prometedora por los siguientes motivos, descritos anteriormente por S.S. Davis (72):

- Es una zona fácilmente accesible, dando lugar a una buena aceptación por el paciente y a la posibilidad de inmunización de grandes grupos poblacionales.
- Se evita el uso de agujas y jeringas.
- Reducida actividad enzimática comparada, por ejemplo, con la vía oral; presenta un epitelio relativamente permeable y amplia superficie de absorción.
- Importante presencia del sistema inmune gracias al tejido linfoide asociado a mucosas (NALT) y la continua vigilancia de las células dendríticas subepiteliales.
- Inducción de respuestas inmunes sistémicas y a nivel de la mucosa.

El principal factor a tener en cuenta durante el desarrollo de una vacuna nasal es que el antígeno administrado pueda llegar a los órganos linfoides inductores que forman parte del NALT y a las células dendríticas que circulan en el área submucosa (Figura 9.5). De esta forma, el antígeno podrá ser captado y procesado por estas células, provocando su maduración y migración a los tejidos linfoides secundarios para presentar el antígeno a las células B y T y llegar a generar una respuesta inmune específica. Es por tanto, un factor crítico la inmunodisponibilidad del antígeno liberado, es decir, es fundamental que éste llegue a las áreas inductoras situadas en la mucosa nasal con el fin de facilitar una interacción inicial con las células dendríticas periféricas. Para ello, se deben superar las diversas barreras biológicas impuestas por la vía nasal: la degradación enzimática, la presencia de mucus que recubre la cavidad nasal y la capa de células epiteliales que recubren la mucosa (35). Teniendo esto en cuenta, mediante la utilización de un sistema de liberación adecuado se podría inducir y mejorar la respuesta inmune alcanzada a través de esta vía promoviendo la captación del antígeno por la células del sistema inmune innato presentes en la zona (20).

Entre las múltiples posibilidades para la liberación del antígeno a través de la vía nasal, diversos tipos de nanosistemas han sido estudiados para conseguir una respuesta inmunológica a través de esta vía y que han sido recientemente revisados (35). Sin embargo, es de especial interés el uso de sistemas nanoparticulados basados en biopolímeros como transportadores de antígenos para conseguir el objetivo final de generar una respuesta inmune protectora y prolongada a través de la vía nasal. En concreto, aquellos basados en poliésteres (PLGA y PLA) y quitosano han sido los más ampliamente estudiados (44). Estos sistemas son especialmente prometedores debido a su demostrada capacidad para proteger las bioma-

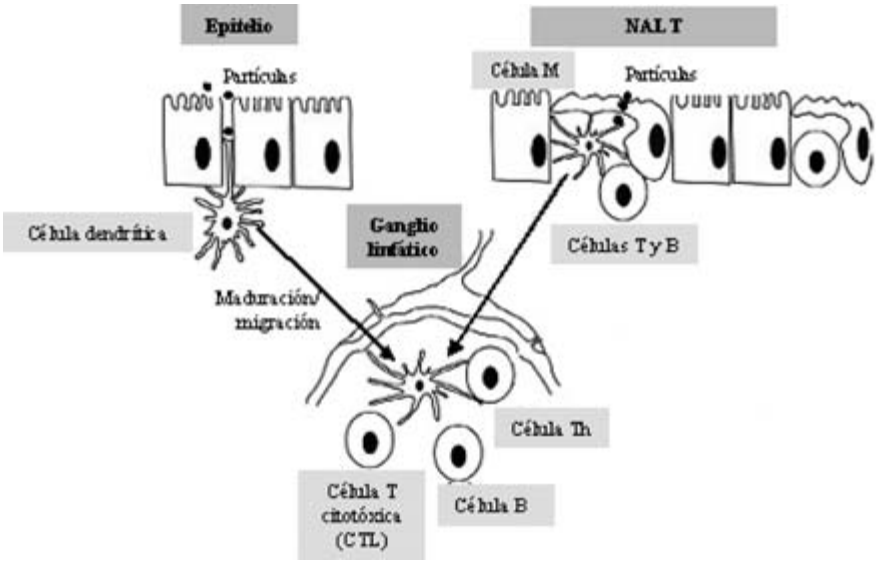


FIGURA 9.5. *Representación esquemática de cómo se produce la cascada de activación de la respuesta inmune específica tras la administración nasal de un sistema de liberación particulado.*

cromoléculas asociadas, promover la interacción y penetración a través de la mucosa nasal para finalmente conseguir el efecto terapéutico sistémico (40, 73-75).

Las nanopartículas basadas en poliésteres han sido uno de los más prometedores candidatos para la liberación de vacunas a través de la vía nasal. Por ejemplo, resultados obtenidos por Jung y col. (68) indican que la aplicación nasal de nanopartículas de PLGA modificado con PVA reduce la dosis de toxoide tetánico necesario para alcanzar una respuesta inmune, comparando en este caso con la vía digestiva.

Sin embargo, importantes problemas relativos a la inestabilidad del antígeno encapsulado en la matriz polimérica de PLGA y el limitado transporte a través de las superficies mucosas, ha dado lugar a una serie de modificaciones en la estructura de los vehículos con el fin de solventar dichos inconvenientes. Las principales modificaciones que se han llevado a cabo se relacionan con la adición de (i) sustancias estabilizadoras del antígeno y (ii) componentes hidrófilos que mejoren la estabilidad del sistema en los fluidos biológicos y permitan una mejor interacción con la mucosa nasal.

Con la introducción de un polímero anfifílico como el poloxamer en la estructura matricial de las nanopartículas de PLGA (76), se ha conseguido pre-

servar la antigenicidad del toxoide tetánico encapsulado. Siguiendo esta estrategia se ha podido además asociar en nanopartículas formadas por mezclas de PLGA con poloxamer o poloxamina, otro tipo de biomacromoléculas como plásmidos ADN codificadores de antígeno (40). Con estos sistemas se logra que el antígeno (β-galactosisada) se exprese a partir del material genético encapsulado, tanto *in vitro* como *in vivo*. La inducción de una respuesta inmunológica específica frente a la β-galactosidasa indica que la molécula de ADN ha sido eficazmente transportada a través de la mucosa nasal, lo que ha permitido que se haya expresado el antígeno y consecuentemente, se ha logrado una respuesta inmune específica sistémica.

Por otro lado, se han desarrollado un tipo de nanopartículas que presentan una estructura núcleo-corona, compuestas por un núcleo hidrofóbico de PLA donde se encuentra el antígeno encapsulado, y una cubierta hidrofílica de polietilenglicol (PEG), con el fin de mejorar la estabilidad del sistema en los fluidos biológicos al mismo tiempo que se mejora la interacción con el epitelio nasal (77). Este tipo de sistema ha demostrado ser un vehículo muy adecuado para la liberación tanto de antígenos como de plásmidos ADN codificadores de antígeno a través de la mucosa nasal y llegar a conseguir niveles importantes de IgG específica frente al toxoide tetánico y la β-galactosidasa, respectivamente (78). Una característica interesante de este sistema es que mediante la modificación del tamaño de partícula y la densidad de la cubierta hidrofílica de PEG, se puede optimizar la interacción con la mucosa nasal para incrementar el transporte de la molécula asociada a través de esta vía de administración (79).

La modificación de la superficie de nanopartículas de PLGA con un polímero hidrofílico, como el quitosano, también se ha llevado cabo con la finalidad de incrementar la interacción con la mucosa nasal, debido fundamentalmente a las propiedades bioadhesivas de este polisacárido. En los estudios de biodistribución (75) que se han llevado a cabo tras el marcaje del toxoide tetánico con un radioisótopo, se puede observar una mayor presencia del toxoide en circulación sistémica cuando se administran las nanopartículas recubiertas con quitosano por la vía nasal comparadas con las nanopartículas sin cubierta. Este resultado indica la eficacia de la modificación superficial de las nanopartículas de PLGA con un polímero bioadhesivo para incrementar la interacción del sistema con la mucosa nasal.

Otros sistemas basados en un núcleo hidrofóbico con cubierta de quitosano han sido desarrollados por Nagamoto y col. (38) para la inmunización nasal. En este caso, el sistema consiste en una nanoemulsión, cuyos glóbulos oleosos están formados por aceite de soja estabilizados con lecitina y posteriormente re-

cubiertos por quitosano. Tras la inmunización nasal con partículas que presentan diversos tamaños, los niveles de IgG alcanzados frente a la ovalbúmina asociada al sistema, concluyen que este parámetro no afecta a la respuesta inmune sistémica. Sin embargo, de forma paralela se ha evaluado el comportamiento de las nanopartículas compuestas únicamente por quitosano bajo las mismas condiciones. En este caso se aprecia como las nanopartículas más pequeñas, de 400 nm, consiguen una mejor respuesta inmune a través de la vía nasal que aquellas de tamaño superior (1 m), siendo incluso mayores que la nanoemulsión recubierta. A la vista de estos resultados, los autores llegan a concluir que a pesar de los importantes niveles de IgG alcanzados con la emulsión recubierta por quitosano, las nanopartículas compuestas únicamente por el polisacárido favorecen en mayor medida el transporte del antígeno a través de la mucosa nasal generando una respuesta inmune sistémica mayor.

Con la idea de evaluar los posibles factores que afectan a la eficacia de las nanopartículas de quitosano como sistemas de liberación de antígeno, se ha estudiado el comportamiento de diversos sistemas elaborados mediante gelificación iónica a partir de quitosano de diferente peso molecular (80). Con los diferentes sistemas evaluados, se consigue una respuesta inmune prolongada frente al toxoide tetánico que se incrementa con el tiempo, lo que demuestra que las nanopartículas de quitosano son capaces de facilitar la liberación del antígeno a las CPA a través de la mucosa nasal y generar una importante respuesta inmune específica. Al mismo tiempo se aprecian ciertas diferencias relacionadas con el peso molecular del quitosano que se ha utilizado en cada formulación testada, de forma que tanto los niveles de IgG e IgA han sido significativamente mayores cuando el quitosano presenta un peso molecular superior.

Por otro lado, se han llevado a cabo modificaciones en la molécula de quitosano con la idea de tratar de solventar los inconvenientes asociados a la baja solubilidad del quitosano a pH fisiológico al no encontrarse en su forma completamente protonizada y la disminución de sus propiedades como promotor de la absorción. La modificación más estudiada, y que ya ha sido utilizada para la elaboración de nanopartículas para la liberación mucosa de antígeno, ha sido la adición parcial de grupos metileno en los residuos amina de la molécula de quitosano. El polímero resultante, N-trimetil quitosano (TMC), presenta buena solubilidad en un amplio rango de pH manteniendo las propiedades bioadhesivas del quitosano, al mismo tiempo que permite la preparación de nanopartículas mediante gelificación iónica. Las nanopartículas elaboradas a partir de este derivado del quitosano, han sido evaluadas como vehículos para la inmunización nasal frente a influenza en ratones (81). Se han conseguido con este sistema, ni-

veles importantes de IgG sérica y una fuerte inhibición de la hemaglutinación, junto con niveles significativos de IgA detectados en los lavados nasales, comparados con los alcanzados con el antígeno solo o mezclado en una solución de polímero. Estos resultados se han atribuido principalmente a las propiedades mucoadhesivas del polímero que permiten una exposición más prolongada del antígeno, así como a la naturaleza particulada del sistema que mejora el acceso al NALT y a los ganglios linfáticos.

Por lo tanto, el uso de sistemas de liberación nanométricos basados en biomateriales, han demostrado que pueden mejorar la respuesta inmune frente al antígeno que transportan cuando se administran a través de una vía no invasiva, como es la vía nasal. Los resultados obtenidos hasta hoy con los diferentes nanosistemas evaluados han sido muy prometedores, y se ha demostrado que modificaciones en la estructura de los nanosistemas que lleven a incrementar su estabilidad y/o la interacción con la mucosa nasal favorecen de forma importante el éxito del sistema para alcanzar respuestas inmunes específicas importantes, tanto sistémicas como a nivel de la mucosa.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA FUTURA

En los últimos años el uso de sistemas de liberación de antígenos ha generado gran interés para el desarrollo de nuevas vacunas. Como hemos descrito previamente, el diseño de nuevas formulaciones para mejorar la efectividad de las vacunas ya existentes, supone una estrategia altamente interesante para ampliar la cobertura inmunológica en la población.

La utilización de sistemas de liberación de tamaño nanométrico ha supuesto un nuevo avance en la evolución de las vacunas. El papel de las nanotecnologías en el diseño de nuevas vacunas tiene especial protagonismo cuando se pretende incrementar la interacción del antígeno transportado con las células del sistema inmune innato, pero es igualmente interesante la mejora del transporte de antígenos a través de las superficies mucosas. Efectivamente, las nanopartículas elaboradas a partir de biomateriales han sido ampliamente estudiadas en los últimos tiempos como vehículos de biomacromoléculas para su administración a través de vías no invasivas, como la vía oral y la nasal. De hecho, están demostrando su capacidad para interaccionar con la mucosa y las células inmunocompetentes de los tejidos linfoides asociados a mucosas para lograr respuestas inmunitarias a nivel sistémico, pero también, generando protección inmunológica a nivel de la mucosa, como avalan los recientes estudios aquí descritos.

Aunque quedan todavía muchos retos por alcanzar en cuanto al diseño de sistemas coloidales para la liberación de vacunas, se pueden llegar conseguir nuevas y mejoradas vacunas mediante un diseño racional proporcionado por el conocimiento multidisciplinar, gracias a los grandes avances en la identificación de dianas inmunológicas y el creciente desarrollo de las nanotecnologías como alternativa para la liberación de vacunas.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Plotkin, S.A. (1994) Vaccines. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.

(2) Liu, M.A. (2003) DNA vaccines: a review. *J. Intern. Med.* 253: 402-410.

(3) Movahedi, A.R. & Hampson, D.J. (2008) New ways to identify novel bacterial antigens for vaccine development. *Vet. Microbiol.* 131(1-2): 1-13.

(4) Plotkin, S.A. (2005) Vaccines: past, present and future. *Nat. Med.* 11(4 (suppl)): S5-11.

(5) Bramwell, V.W. & Perrie, Y. (2005) The rational design of vaccines. *Drug Discov. Today*. 10(22): 1527-1534.

(6) McCullers, J.A. (2007) Evolution, benefits, and shortcomings of vaccine management. *J. Manag. Care Pharm.* 13(7, S-b): S2-S6.

(7) O'Hagan, D.T. & Rappuoli, R. (2004) The safety of vaccines. *Drug Discov. Today*. 19: 846-854.

(8) Duclos, P. (2004) A global perspective on vaccine safety. *Vaccine*. 22: 2059-2063.

(9) Barouch, D.H. (2006) Rational design of gene-based vaccines. *J. Pathol.* 208: 283-289.

(10) Friede, M. & Aguado, M.T. (2005) Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. *Adv. Drug Deliver. Rev*. 57: 325.

(11) Simonsen, L., Kane, A., Lloyd, J., Zaffran, M. & Kane, M. (1999) Unsafe injections in the developing world and transmission of bloodborne pathogens: a review. *B World Health Organ*. 77(10): 789-800.

(12) Jodar, L., Duclos, P., Milstien, J., Griffiths, E., Aguado, M.T. & Clements, C.J. (2001) Ensuring vaccine safety in immunization programmes - a WHO perspective. *Vaccine*. 19: 1594-1605.

(13) Drain, P.K., Nelson, C.M. & Lloyd, J.S. (2003) Single-dose versus multi-dose vials for immunization programmes in developing countries. *B World Health Organ*. 81(10): 726-731.

(14) Clements, C.J., Larsen, G. & Jodar, L. (2004) Technologies that make administration of vaccines safer. *Vaccine*. 22: 2054-2058.

(15) Matthias, D.K., Robertson, J., Garrison, M.M., Newland, S. & Nelson, C. (2007) Freezing temperatures in the vaccine cold chain: A systematic literature review. *Vaccine*. 25: 3980-3986.

(16) Zapata, M.I., Peck, G.E., Hem, S.L., White, J.L. & Feldkamp, J.R. (1984) Mechanism of freeze-thaw instability of aluminum hydroxycarbonate and magnesium hydroxide gels. *J. Pharm. Sci*. 73: 3-9.

(17) Galazka, A., Milstien, J.B. & Zaffran, M. (1998) Thermostability of vaccines. 1.ª ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

(18) Edwards, K.M. & Decker, M.D. (1997) Combination vaccines consisting of acellular pertussis vaccines. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 16(4): S97-S102.

(19) Ryan, E.J., Daly, L.M. & Mills, K.H.G. (2001) Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotechnol*. 19(8): 293-303.

(20) O'Hagan, D.T. & Rappuoli, R. (2004) Novel approaches to vaccine delivery. *Pharm. Research*. 21(9): 1519-1529.

(21) Clements, C.J. & Griffiths, E. (2002) The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine*. 20: S24-S33.

(22) Lindbald, E.B. (2004) Aluminium adjuvants - in retrospect and prospect. *Vaccine*. 22: 3658-3668.

(23) Puig-Barberà, J., Díez-Domingo, J., Belenguer Varea, A., Schwarz Chavarri, G., Lluch Rodrigo, J.A., Pérez Hoyos, S., et al. (2007) Effectiveness of MF59TM-adjuvanted subunit influenza vaccine in preventing hospitalisations for cardiovascular disease, cerebrovascular disease and pneumonia in the elderly. *Vaccine*. 25: 7313-7321.

(24) O'Hagan, D.T. & Rappuoli, R. (2006) Novel approaches to pediatric vaccine delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev*. 58: 29-51.

(25) Moingeon, P., De Taisne, C. & Almond, J. (2002) Delivery technologies for human vaccines. *Brit. Med. Bull*. 62: 29-44.

(26) Moingeon, P., Haensler, J. & Lindberg, A. (2001) Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine*. 19(31): 4363-4372.

(27) Preis, I. & Langer, R. (1979) A single-step immunization by sustained antigen release. *J. Immunol. Methods*. 28: 193-197.

(28) Aguado, M.T. (1993) Future approaches for vaccine development - single-dose vaccines using controlled-release delivery systems. *Vaccine*. 11(5): 596-597.

(29) Tobio, M., Schwendeman, S.P., Guo, Y., McIver, J., Langer, R. & Alonso, M.J. (2000) Improved immunogenicity of a core-coated tetanus toxoid delivery system. *Vaccine*.18: 618-622.

(30) Jaganathan, K.S. & Vyas, S.P. (2006) Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant Hepatitis B antigen administered intranasally. *Vaccine*. 24: 4201-4211.

(31) Feng, L., Qi, X.R., Zhou, X.J., Maitani, Y., Wang, S.C., Jiang, Y. et al. (2006) Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres. *J. Control. Release*. 112: 35-42.

(32) Davis, S.S. (2006) The use of soluble polymers and polymer microparticles to provide improved vaccine reponses after parenteral and mucosal delivery. *Vaccine*. 24(S2): 7-10.

(33) Alonso, M.J., Cohen, S., Park, T.G., Gupta, R.K., Siber, G.R. & Langer, R. (1993) Determinants of release rate or tetanus vaccine from polyester microspheres. *Pharm. Research*. 10(7): 945-953.

(34) Sánchez, A., Gupta, R.K., Alonso, M.J., Siber G.R. & Langer, R. (1996) Pulsed controlled-release system for potential use in vaccine delivery. *J. Pharm. Sci*. 85(6): 547-552.

(35) Csaba, N., García-Fuentes, M. & Alonso, M.J. (2008) Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv. Drug Deliver. Rev*. Dec 13.

(36) Sheng, K., Kalkanidis, M., Pouniotis, D.S., Esparon, S., Tang, C.K., Apostolopoulos, V. et al. (2008) Delivery of antigen using a novel mannosylated dendrimer potentiates immunogenicity in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol*. 38: 424-436.

(37) Vangala, A., Kirby, D., Rosenkrands, I., Agger, E.M., Andersen, P. & Perrie, Y. (2006) A comparative study of cationic liposome and niosome-based adjuvant system for protein subunit vaccines: characterization, enviromental scanning electron microscopy and immunisation studies in mice. *J. Pharm. Pharmacol*. 58(6): 787-799.

(38) Nagamoto, T., Hattori, Y., Takayama, K. & Maitani, Y. (2004) Novel chitosan particles and chitosan-coated emulsions inducing response via intranasal vaccine delivery. *Pharm. Research*. 21(4): 671-674.

(39) Seow, W.M., Xue, J.M. & Yang, Y.Y. (2007) Targeted and intracellular delivery of paclitaxel using multi-functional polymeric micelles. *Biomaterials*. 28(9): 1730-1740.

(40) Csaba, N., Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2006) PLGA: poloxamer and PLGA: poloxamine blend nanostructrues as carriers for nasal gene delivery. *J. Control. Release*. 113(2): 164-172.

(41) Orive, G., Gascón, A.R., Hernández, R.M., Domínguez-Gil, R.A. & Pedraz, J.R. (2004) Techniques: New approaches to the delivery of biopharmaceuticals. *Trends Pharmacol. Sci.* 25(7): 382-387.

(42) Neutra, M.R. & Kozlowski, P.A. (2006) Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 148-158.

(43) Peek, L.J., Middaugh, C.R. & Berkland, C. (2008) Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug Deliver Rev.* 60: 915-928.

(44) Köping-Högard, M., Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2005) Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert Rev. Vaccines.* 4(2): 185-196.

(45) Des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J. & Préat, V. (2006) Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J. Control. Release.* 116: 1-26.

(46) Reddy, S.T., Swartz, M.A. & Hubbell, J.A. (2006) Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.* 27(12): 573-579.

(47) Mutwiri, G., Benjamin, P., Soita, H., Townsend, H., Yost, R., Roberts, B, et al. (2007) Poly[di(sodium carboxylatoethylphenoxy)phosphazene] (PCEP) is a potent enhancer of mixed Th1/Th2 immune responses in mice immunized with influenza virus antigens. *Vaccine.* 25: 1204-1213.

(48) Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P. & Bachmann, M.F. (2008) Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *J. Immunol.* 38: 1404-1413.

(49) Banchereau, J. & Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392(6673): 245-252.

(50) Panyam, J. & Labhasetwar, V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cell and tissue. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 55: 329-347.

(51) Xiang, S.D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P.L., et al. (2006) Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods.* 40: 1-9.

(52) Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K.L. (1995) A phagosome-to-cytosol pathway or exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science.* 267(5195): 243-246.

(53) Elemanchili, P., Lutsiak, C.M., Hamdy, S., Diwan, M. & Samuel, J. (2007) «Pathogen-mimicking» nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *J. Immunother.* 30(4): 378-395.

(54) Zwiorek, K., Bourquin, C., Battiany, J., Winter, G., Endres, S., Hartamann, G., et al. (2008) Delivery of cationic gelatin nanoparticles strongly increases the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides. *Pharm. Research.* 25(3): 551-562.

(55) Wang, X., Uto, T., Akagi, T., Akashi, M. & Baba, M. (2008) Poly(Á-glutamic acid) nanoparticles as an efficient antigen delivery and adjuvant system: potential for an AIDS vaccine. *J. Med. Virol*. 80: 11-19.

(56) Kerkmann, M., Lochmann, D., Weyermann, J., Marschner, A., Poeck, H., Wagner, M. et al. (2006) Immunostimulatory properties of CpG-oligonucleotides are enhanced by the use of protamine nanoparticles. *Oligonucleotides*. 26: 313-322.

(57) Elemanchili, P., Diwan, M., Cao, M. & Samuel, J. (2004) Characterization of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine*. 22: 2406-2412.

(58) Coester, C., Nayyar, P. & Samuel, J. (2006) In vitro uptake of gelatin nanoparticles by murine dendritic cells and their intracellular localisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 62: 306-314.

(59) Akagi, T., Wang, X., Uto, T., Baba, M. & Akashi, M. (2007) Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly(amino acid) derivatives. *Biomaterials*. 28: 3427-3426.

(60) Dobrovolskaia, M.A. & McNeil, S.E. (2007) Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol*. 2(8): 469-478.

(61) Guidice, E.L. & Campbell, J.D. (2006) Needle-free vaccine delivery. *Adv. Drug Deliver Rev.* 58: 68-89.

(62) De la Fuente, M., Csaba, N., Garcia-Fuentes, M. & Alonso, M.J. (2008) Nanoparticles as protein and gene carriers to mucosal surfaces. *Nanomed*. 3(6): 845-857.

(63) Alonso, M.J. (2004) Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomed. Pharmacother*. 58: 168-172.

(64) Prego, C., García, M., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) Transmucosal macromolecular drug delivery. *J. Control. Release*. 101: 151-162.

(65) Janes, K.A., Calvo, P. & Alonso, M.J. (2001) Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Deliver Rev*. 47: 83-97.

(66) Holmgren, J. & Czerkinsky, C. (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med*. 11(4): S45-S53.

(67) O'Hagan, D.T. (1996) The intestinal uptake and the implications for drug and antigen delivery. *J. Anat*. 189: 447-482.

(68) Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Hungerer, K.D., Hundt, E. & Kissel, T. (2001) Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide): evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice. *Pharm. Research*. 18(3): 352-360.

(69) Gupta, P.N., Khatri, K., Goyal, A.K., Mishra, N. & Vyas, S.P. (2007) M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization agains hepatitis B. *J. Drug Target*. 15(10): 701-713.

(70) Borges, O., Cordeiro-da-Silva, A., Romeijn, S.G., Amidi, M., De Sousa, A., Borchard, G., et al. (2006) Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *J. Control. Release*. 114: 348-358.

(71) Borges, O., Tavares, J., De Sousa, A., Borchard, G., Junginger, H.E. & Cordeiro-da-Silva, A. (2007) Evaluation of the immune response following a short oral vaccination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci*. 32(4-5): 278-290.

(72) Davis, S.S. (2001) Nasal vaccines. *Adv. Drug Deliver Rev*. 51: 21-42.

(73) Fernández-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Research*. 16(10): 1576-1581.

(74) Prego, C., Torres, D. & Alonso, M.J. (2006) Chitosan nanocapsules: a new carrier for nasal peptide delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Tec*. 16(5): 331-337.

(75) Vila, A., Sánchez, A., Tobío, M., Calvo, P. & Alonso, M.J. (2002) Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Control. Release*. 78(1-3): 15-24.

(76) Tobio, M., Nolley, J., Guo, Y., McIver, J. & Alonso, M.J. (1999) A novel nanosystem based on a poloxamer/PLGA blend as a tetanus toxoid delivery vehicle. *Pharm. Research*. 16: 682-688.

(77) Tobio, M., Gref, R., Sánchez, A., Langer, R. & Alonso, M.J. (1998) Stealth PLA-PEG nanoparticles as nasal protein delivery systems. *Pharm. Research*. 15(270): 275.

(78) Vila, A., Sánchez, A., Pérez, C. & Alonso, M.J. (2002) PLA-PEG nanospheres: new carriers for transmucosal delivery of proteins and plasmid DNA. *Polym. Advan. Technol*. 13: 851-858.

(79) Vila, A., Gill, H., McCallion, O. & Alonso, M.J. (2004) Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *J. Control. Release*. 98: 231-244.

(80) Vila, A., Sánchez, A., Janes, K., Behrens, I., Kissel, T., Vila-Jato, J.L., et al. (2004) Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 57: 123-131.

(81) Amidi, M., Romeijn, S.G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., Bungener, L., Hunckriede, A., et al. (2007) N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: biological properties and immunogenicity in mouse model. *Vaccine*. 25(1): 144-153.

10. Otras aplicaciones farmacoterapéuticas

JUAN M. IRACHE

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Universidad de Navarra.

Este heterogéneo capítulo está dividido en varias secciones. En la primera sección se considera el uso de la nanotecnología para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por hongos, parásitos, bacterias y virus. En la segunda sección se revisa el uso de estas tecnologías para el tratamiento de enfermedades metabólicas, principalmente la diabetes tipo I y la osteoporosis. Finalmente, en la última parte del este capítulo se recogen algunos trabajos sobre el potencial de las nanopartículas en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, la inflamación y el alivio del dolor.

APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Aunque en el último siglo se han realizado importantes progresos en el control de las enfermedades infecciosas, estas representan todavía un problema importante de salud pública que sigue necesitando, de manera urgente, nuevos tratamientos alternativos.

Las causas de las infecciones son múltiples y la búsqueda de nuevas moléculas y tratamientos es complicado. Todo ello es debido a numerosos factores entre los que destaca la constante modificación de los patógenos y la aparición de mecanismos de resistencia. Otro factor importante es el creciente número de individuos inmunocomprometidos entre los pacientes que requieren este tipo de tratamientos. Este fenómeno está asociado al envejecimiento de la población, el aumento del número de pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y al incremento en el número de pacientes tratados con terapias inmunosupresoras.

Dentro de los diferentes tipos de infecciones, aquellas causadas por patógenos intracelulares son las más dificultosas de erradicar. En realidad los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias para su supervivencia en el interior de la célula huésped, destacando los siguientes: (i) inhibición de la fusión entre fagosomas y lisosomas, (ii) resistencia al ataque de las enzimas lisosomales, agentes oxigenados y defensinas de los macrófagos o células huésped, o (iii) escape desde el fagosoma al citoplasma. Dentro del grupo de los microorganismos intracelulares obligados destacan *Legionella pneumophila*, *Toxoplasma gondii* o *Clamidia trachomatis*. Igualmente, ciertos patógenos intracelulares facultativos como Salmonella spp., *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Brucella melitensis*, también, son un problema significativo.

Muchos de estos patógenos intracelulares son capaces de infectar los macrófagos (y otras células del sistema inmune), utilizándolas como reservorios para patógenos capaces de colonizar otros tejidos o células dando lugar a infecciones recurrentes. En pacientes inmunocomprometidos, ciertas infecciones oportunistas causadas por Salmonella spp. o por micobacterias atípicas son mucho más frecuentes. Así, en pacientes infectados con VIH la incidencia de salmonelosis (principalmente debida a *S. typhimurium*) es entre 15 y 100 veces mayor que en pacientes sanos. Otro tipo de infecciones muy frecuentes son las causadas por el complejo *M. avium-M. intracellulare* que dan lugar a las infecciones oportunísticas pulmonares no tuberculosas más frecuentes en pacientes con el sistema inmune debilitado (1).

Por lo que respecta a los fármacos antiinfecciosos, algunos de ellos son extremadamente irritantes y tóxicos y existe un gran interés en encontrar nuevos caminos para formularlos de manera más segura y eficaz (2-5). Por otra parte, estas moléculas activas necesitan alcanzar el nivel celular/subcelular donde los patógenos están escondidos y, desgraciadamente, esto suele ser bastante complicado (6, 7). Además, otra dificultad añadida a la terapia antiinfecciosa es que algunos patógenos son quiescentes o durmientes. Estos microorganismos están presentes en un estado reversible y pueden persistir durante largos periodos sin dividirse bajo una forma viable pero no «cultivable» (8). En ese caso, las dianas de los fármacos están expresadas en pequeño número y la permeabilidad celular está alterada, influenciando su susceptibilidad a estos agentes (9).

En cualquier caso, la nanotecnología puede ser una herramienta adecuada para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Es bien conocido que las nanopartículas (poliméricas, lipídicas, liposomas, etc.) al ser administradas por vía intravenosa se concentran preferentemente en órganos con alta capacidad

fagocítica y en monocitos circulantes (10, 11). En realidad, una vez en sangre, ciertas proteínas plasmáticas (opsoninas) son capaces de interaccionar y adsorberse sobre la superficie de las nanopartículas. Este fenómeno, facilita su reconocimiento por las células del sistema monocito-macrofágico o sistema fagocítico mononuclear (MPS). Por ello, las partículas submicrónicas se acumulan en el hígado (principalmente en las células de Kuppfer), el bazo y la médula ósea. De todas formas, tanto la captación como su concentración en estas células son dependientes de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas. Aquellas con tamaños inferiores a 100 nm o recubiertas con moléculas hidrofílicas (polietilenglicoles, dextranos, etc…) sufren un menor grado de opsonización. Por ello, el tiempo de circulación en sangre de estas formas de dosificación es mucho mayor, permitiendo que puedan alcanzar otros lugares del organismo.

La Figura 10.1 resume las ventajas generales que puede aportar la nanotecnología en la formulación de este tipo de los fármacos antiinfecciosos.

Infecciones parasitarias y por hongos

En la actualidad, las infecciones fúngicas no son las de mayor prevalencia dentro de la práctica hospitalaria, pero sí son las de mayor tasa de morbilidad y mortalidad en los receptores de un transplante de órgano sólido o en aquellos pacientes inmunocomprometidos debido a terapias agresivas, tratamientos oncológicos o infecciones por VIH. El tratamiento de estas infecciones presenta además un gran número de complicaciones, reintervenciones y fracasos terapéuticos.

Por otra parte, la utilización de nanotecnologías para la administración sistémica de antiinfecciosos frente a parásitos responsables de infecciones severas tales como leishmaniasis visceral, candidiosis o malaria ha sido propuesta como una estrategia interesante para aumentar la eficacia de estos fármacos (14-19). En general tanto los liposomas como las nanopartículas lipídicas o poliméricas han demostrado una capacidad superior al fármaco libre para el tratamiento de este tipo de infecciones.

La Tabla 10.1 resume algunos de los trabajos que recogen la utilización de nanosistemas para la administración intravenosa de antifúngicos. En muchos ejemplos, la toxicidad del fármaco se ve fuertemente reducida mientras que en otros casos también se observan incrementos muy importantes en la eficacia del tratamiento.

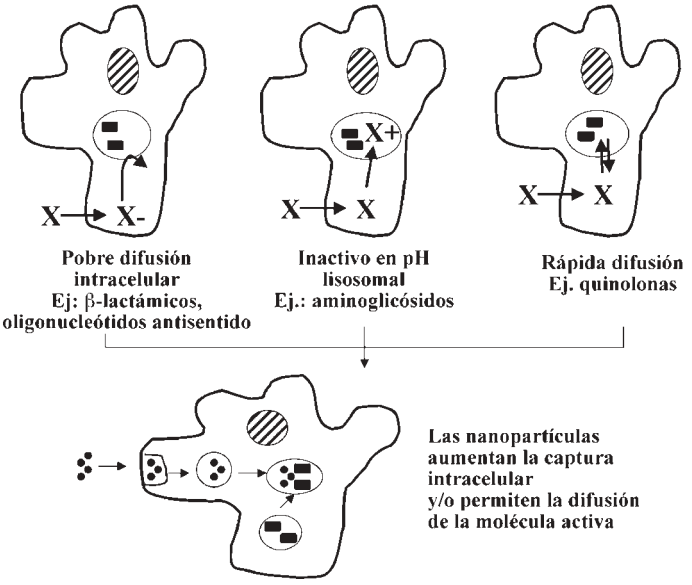


FIGURA 10.1. *Representación esquemática de cómo las nanopartículas pueden aumentar la concentración intracelular de antibióticos, antifúngicos y/o antivirales. Los tres mayores problemas identificados: pobre penetración o difusión intracelular (incluido difusión a los lisosomas), inactivación del fármaco por el pH ácido lisosomal y, dependiendo de sus características fisicoquímicas, rápida difusión o mecanismos de entrada-salida desde componentes intracelulares. Las nanopartículas podrían resolver estos problemas mediante un incremento de la captura intracelular (ej., mediante endocitosis) y/o permitiendo que el principio activo difunda libremente dentro de la célula (ej. mediante mecanismo de fusión de los lisosomas) [adaptada de 12, 13].*

La primera nanomedicina puesta en el mercado para el tratamiento de infecciones fúngicas severas fue Ambisome® (NeXstar, hoy en día Gilead). Esta formulación de anfotericina B liposomal permitía reducir entre 50 y 70 veces la toxicidad del antifúngico observada con la formulación tradicional (asociación de desoxicolato y antifúngico) (32). Como consecuencia de esta drástica reducción de la toxicidad, la cantidad de anfotericina B que se puede administrar a un paciente se ve aumentada 5 veces. El éxito de esta formulación se relacionó con la capacidad de los liposomas por alcanzar y concentrarse en las células del sistema monocito-macrofágico. Sin embargo, el pequeño tamaño de estos liposomas (< 100 nm) también favorecía que una porción importante de la dosis inyectada escapara al aclaramiento inmediato por parte de los macrófagos del hígado y del bazo. Por ello, estos liposomas con anfotericina B pueden viajar a través del torrente sanguíneo durante un periodo de tiempo prolongado y, así, acceder a otros tejidos infectados como pueden ser los pulmones, el hígado, los riñones y el cerebro. Como consecuencia de ello, la formulación es efectiva frente a microorganismos fagocitados y no fagocitados (33).

TABLA 10.1. *Utilización de liposomas y nanopartículas como vehículos para el tratamiento de infecciones fúngicas.*

Formulación Referencia	Fármaco	Modelo	Infección experimental	Resultado
Liposomas 20	Anfotericina B	Ratón	*Cryptococcus neoformans*	Aumento de la tasa de supervivencia y menor cantidad de células viables que controles
Liposomas 21	Anfotericina B	Ratón	*Histoplasma capsulatum*	• Disminución de la toxicidad aguda • Dosis máxima tolerable 9 veces mayor que control
Ambisome® 22	Anfotericina B	Ratón	Varios	Efectivo en infecciones intracelulares (leishmaniasis, histoplasmosis) y extracelulares (candidiosis, aspergilosis)
Liposomas 23	Complejo anfotericina B: ciclodextrinas	Ratón	• *Cryptococcosis neoformans* • *Aspergillus fumigatus*	Reducción de la toxicidad al utilizar complejos con HPCD o SBECD
Liposomas pegilados 24	Anfotericina B	Ratón	*Candida albicans*	Menos efectivo frente a infección experimental
Liposomas funcionalizados con PAM	Anfotericina B	Rata	—	Acumulación del fármaco en higado y bazo
Liposomas funcionalizados con OPM 25				Acumulación del fármaco en pulmón
Nanoesferas P 26	Anfotericina B	Ratón	*Candida albicans*	Actividad menor que fármaco libre pero menor toxicidad
Nanoesferas lipídicas 27	Anfotericina B	Varios	*Candida albicans*	En perro, niveles plasmáticos 3 veces superior a Ambisome En rata, buena eficacia antifúngica
Liposomas 28; 29	Nistatina	Ratón	*Aspergillus spp.*	Disminución toxicidad hemolítica y aumento eficacia
Liposomas 30	Nistatina	Conejo	*Aspergillus fumigatus*	Aumento eficacia frente aspergillosis diseminada
Liposoma 31	Nistatina	Ratón	*Crytococcus neoformans*	Aumento eficacia

PAM: p-aminofenil-manopiranosido; OPM: O-palmitoil-manano; PEC: poli(epsilon-caprolactona); HPCD: hidroxipropil-beta-ciclodextrina; SBECD: sulfobutileter-beta-ciclodextrina.

Ambisome, aparte de ser utilizado en el tratamiento específico de micosis sistémicas graves, ha demostrado en los últimos años una gran actividad para el tratamiento de la leishmaniasis visceral (16). El mayor problema de Ambisome sigue siendo su coste (estimado en 2004 en unos 16.000-20.000 euros/mes frente a 127 euros para la formulación convencional) (34, 35). En cualquier caso, existen varios estudios que demuestran que el coste en la adquisición del fármaco se ve justificado debido a la disminución de los gastos derivados de los efectos adversos asociados al uso de la presentación convencional de anfotericina B (36, 37). Así, en un estudio con pacientes sometidos a transplante hepático, se ha demostrado que Ambisome ofrece una menor incidencia de infecciones fúngicas invasoras (Candida spp. o Aspergillus spp.) que el tratamiento convencional (del 6% frente al 17%) (37); incluso cuando Ambisome se administra por nebulización en la profilaxis de aspergillosis en los receptores de un transplante pulmonar (38). Desde un punto de vista farmacoeconómico, se comparó la utilización de anfotericina B liposomal frente a anfotericina B convencional en el tratamiento empírico de fiebre persistente en pacientes neutropénicos (39). El coste de hospitalización por paciente a lo largo de toda la estancia fue inferior en aquellos individuos tratados con la especialidad liposomal frente a la anfotericina convencional. Este resultado ha sido atribuido a la menor incidencia de nefrotoxicidad observada con la anfotericina B liposomal.

En cualquier caso, y debido a este problema económico, se han hecho considerables esfuerzos para desarrollar formulaciones alternativas con menores precios. En este contexto, se propuso una nueva formulación lipídica de anfotericina B (Abelcet®) que presentaba una cantidad de lípidos 3 veces inferior a la incluida en Ambisome. Esta formulación, aunque sensiblemente más barata que Ambisome, es ligeramente peor en términos de eficacia.

Por otra parte, Larabi y colaboradores demostraron que unos nanodiscos lipídicos conteniendo anfotericina B (diámetro de 250 nm y 3 nm de espesor) se podían obtener con una composición en lípidos muy parecida a la de Abelcet pero modificando el método de preparación. Estos nanodiscos, aunque menos activos que Ambisome, parecen más eficientes que Abelcet para reducir la infección por *Leishmania donovani* en un modelo murino de leishmaniasis visceral (40).

Las nanopartículas poliméricas, en principio más baratas que las mezclas lipídicas, también se han desarrollado como vehículos para anfotericina B (41, 42). En estos trabajos se demostró que tanto nanoesferas de poli(épsilon-caprolactona) como micelas mixtas con Pluronic F68 podían incorporar de manera eficiente anfotericina B. Además, la asociación de anfotericina B en nanoesferas de poli(ép-

silon-caprolactona) permite aumentar de manera significativo la eficacia del antifúngico frente a amastigotes de *Leishmania donovani* (43). De la misma manera, utilizando promastigotes de *Leishmania donovani* resistente a anfotericina B, se pudo observar una reversión de dicha resistencia al utilizar micelas mixtas entre Pluronic F68 y el antifúngico (44). Por último, estas formulaciones fueron evaluadas para testar su eficacia terapéutica en un modelo de candidiosis experimental en ratones neutropénicos (26). De igual forma a lo observado con Ambisome, la formulación de nanoesferas disminuía la actividad antifúngica del fármaco libre pero, en paralelo, permitía reducir de forma importante la toxicidad renal de anfotericina B y permitiría administrar mayores concentraciones del polieno.

Otros fármacos utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis también han sido incorporados en vehículos submicrónicos. Así, nanopartículas de poli(hexilcianoacrilato) conteniendo primaquina aumentaban más de veinte veces la actividad del fármaco libre frente a *L. donovani* (45). De la misma forma, en diferentes especies animales con infección aguda, los niosomas conteniendo estibogluconato sódico son más efectivos eliminado el parásito del hígado, bazo y médula ósea que Ambisome o Abecet y ofrecen elevados niveles tisulares del fármaco durante largos periodos de tiempo (46, 47). Igualmente, la encapsulación de amarogentina encapsulada en liposomas o en niosomas aumenta la eliminación del parásito de los bazos de hamsters infectados de forma experimental (48). Por otra parte, la toxicidad de andrografólido (49) y dehidroemetina (50) (utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis) se reduce drásticamente tras su incorporación en liposomas o nanoesferas, respectivamente. En otro interesante estudio se pudo demostrar como la incorporación de arjunglucosido en nanogeles hidrofílicos o en nanoesferas de ácido poliláctico (PLA) permitía reducir de forma importante la hepatotoxicidad y neurotoxicidad del fármaco libre. En paralelo, estas formulaciones mostraban una actividad similar en un modelo experimental de leishmaniasis, caracterizada por una reducción de la carga parasitaria del bazo cercana al 80%; mientras, para el fármaco libre esta reducción era de solamente el 38% (51).

En el caso de malaria, la situación es diferente. En este caso, el parásito se localiza en los glóbulos rojos. Por ello, la nanotecnología usada para reducir la toxicidad de los principios activos necesita bien permanecer en el torrente sanguíneo o interaccionar con los glóbulos rojos infectados. Unos pocos estudios han considerado la administración de antipalúdicos con liposomas capaces de interaccionar específicamente con glóbulos rojos infectados. Para ello, el «anclaje» de los liposomas a estás células tiene lugar mediante la utilización de fragmento F(ab´) que se demostró muy efectivo para controlar la parasitosis.

Los liposomas conteniendo cloroquina fueron incluso capaces de curar infecciones resistentes a este fármaco (19).

Liposomas pegilados y nanocápsulas parecen también superiores al principio activo libre para tratar la malaria (52, 53). Así, por ejemplo, varias formulaciones de halofantrina encapsulada en nanocápsulas fueron evaluadas en ratones infectados con *Plasmodium berghei* (52). La formulación de nanocápsulas se reveló superior a la formulación convencional de halofantrina ya que el uso de estas nanopartículas permitía enmascarar los efectos tóxicos del fármaco. Los resultados farmacocinéticos mostraron que la formulación de nanocápsulas, especialmente las formulaciones pegiladas, permitían perfiles plasmáticos de halofantrina más favorables. Además, el AUC de halofantrina en plasma fue 6 veces superior con la formulación de nanocápsulas comparadas con la solución. Más recientemente, utilizando nanoesferas de Gantrez AN conteniendo cloroquina, se ha demostrado incrementos importantes de su biodisponibilidad oral en ratones. Así, estas nanopartículas fueron capaces de multiplicar por 3 la biodisponibilidad oral de este fármaco (comparado con formulaciones convencionales) y permitir niveles plasmáticos efectivos durante al menos 3 días (datos no publicados).

Por otra parte, y debido a la localización de los parásitos, el uso de ligandos específicos en la superficie de nanopartículas o la pegilación de las mismas puede ser interesante para aumentar la actividad y eficacia de estos sistemas. En el caso de lso ligandos capaces de reconocer de manera específica algún receptor de la superficie celular, se han propuesto manosa (54), péptidos (tuftsina) y anticuerpos. Así, la utilización de liposomas funcionalizados con tuftsina ha permitida aumentar la eficacia de estibogluconato sódico (55, 56) y anfotericina B (56, 57). Por otra parte, los inmunoliposomas (resultantes tras la asociación de anticuerpos a la superficie de liposomas) favorecen el acceso de los principios activos a la médula ósea, el tracto gastrointestinal y la piel; órganos que suelen actuar de reservorio para algunos de estos patógenos y causantes de las recaídas (58, 59). Por lo que respecta a la pegilación, los sistemas «stealth» o furtivos también pueden ser interesantes para incrementar las concentraciones de antifúngicos en pulmón y riñón. Sin embargo, los resultados obtenidos tras la administración de diferentes formulaciones de liposomas pegilados conteniendo anfotericina B en ratones infectados neutropénicos no han sido concluyentes (24, 53).

Infecciones bacterianas

Las nanotecnologías ofrecen también una serie de ventajas interesantes para la administración de antibióticos en infecciones causadas por bacterias.

En general, la encapsulación de antibióticos en liposomas o en nanopartículas aumenta la dosis máxima tolerada y el índice terapéutico de estos fármacos en comparación con las formas farmacéuticas convencionales. Esto puede explicarse por una modificación del perfil farmacocinético del antibiótico cuando está encapsulado y por una modificación de su distribución en el organismo.

Infecciones debidas a micobacterias

Las infecciones debidas a micobacterias son un problema sanitario importante ya que estos microorganismos son responsables de numerosas enfermedades, como la tuberculosis, así como de algunas de las infecciones oportunistas que más afectan a los pacientes inmunodeprimidos. La tuberculosis, causada por *M. tuberculosis*, es una infección pulmonar común, endémica en algunas regiones. Su incidencia ha aumentado recientemente, ya que está frecuentemente asociada al VIH. Por otra parte el complejo *M. avium - M. intracellulare* (MAC) es la principal causa de complicaciones en pacientes inmunodeprimidos (60, 61).

En general, los aminoglicósidos son eficaces frente a las infecciones causadas por micobacterias. Sin embargo, estos presentan una baja capacidad para atravesar las membranas celulares e importantes efectos secundarios, como nefrotoxicidad y ototoxicidad (62). La encapsulación de estos antibióticos en liposomas ha mostrado, en general, un aumento importante de su eficacia terapéutica tanto in vitro como in vivo. Así por ejemplo, en una formulación liposomal de amikacina (denominada Mikasome®, Gilead), el antibiótico fue entre 2 y 6 veces más activo que el principio activo libre y que la estreptomicina en un modelo agudo de tuberculosis en ratón (63). Además se ha demostrado que esta formulación permite prolongar los niveles de antibiótico en plasma, aumentando la eficacia del mismo frente a infecciones por Mycobacterium spp., Kleibsella spp. y Pseudomonas spp (64). En modelos animales infectados con el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, amikacina liposomal permitió reducir en 3 logaritmos (1.000 veces) el número de bacterias viables en hígado, bazo y, en menor medida, en pulmones, comparados con el control no tratado (64-66). Resultados similares han sido descritos por otros autores con formulaciones de amikacina liposomal de composición semejante a la descrita anteriormente (67, 68).

Liposomas conteniendo estreptomicina también permitieron prolongar la supervivencia de ratones infectados con Mycobacterium spp. y producir una inhibición significativa del crecimiento bacteriano en el hígado y en el bazo, pero no en los pulmones (69, 70). La ausencia de concentración del antibiótico en los pulmones parece ser debido a que los liposomas empleados presentaban una carga superficial neutra que favorecería una mayor circulación en el torrente circulatorio que, por ejemplo, los liposomas catiónicos que tienden a concentrarse en estos órganos.

Sin embargo, en algunas infecciones experimentales por micobacterias, el efecto superior de los liposomas también ha sido observado en los pulmones. Así, la eficacia de kanamicina liposomal (71) o de estreptomicina liposomal (72) fue significativamente mayor a la obtenida con el fármaco libre. Igualmente, gentamicina encapsulada en liposomas de fosfatidilcolina reducía en 3 logaritmos el número de bacterias viables en los pulmones de ratones infectados con *Kleibsiella pneumoniae* y aumentaba el tiempo de supervivencia hasta más de 15 días, comparados con los 8 días obtenidos con el principio activo libre (73). La Tabla 10.2 recoge algunos ejemplos de utilización de nanotecnologías en el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias.

En general, se puede afirmar que estas nanomedicinas presentan resultados bastante prometedores. Sin embargo, muchos de los datos obtenidos con estas nuevas formulaciones se han realizado con animales sanos (con el sistema inmune intacto y con bacterias altamente susceptibles a los antibióticos); a pesar de que en la práctica clínica los tratamientos son administrados a pacientes con el sistema inmune afectado o que han sido infectados por microorganismos con baja susceptibilidad a los antibióticos empleados. En cualquier caso, la erradicación completa de los patógenos localizados en pulmón es bastante difícil y así se demostró al realizar ensayos clínicos con Mikasome destinados a tratar pacientes infectados con tuberculosis. Estos ensayos fallaron ya que el antibiótico era liberado en macrófagos que se encontraban relativamente lejos de los bacilos extracelulares y de aquellos localizados en los focos de necrosis caseosa en la infección humana (63). En el caso del tratamiento de la tuberculosis, es bien conocido que concentrar el antibiótico en los lugares donde se localizan los bacilos extracelulares sigue siendo un desafío y un problema importante a resolver (79).

TABLA 10.2. *Ejemplos de utilización de nanotecnologías en el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias.*

Formulación Referencia	Fármaco	Modelo	Infección experimental	Resultado
Liposomas 74	Claritromicina Ofloxacino	Macrófagos humanos	*Mycobacterium avium - M. intracellulare*	Reducción del número de UFCs en macrófagos infectados
Liposomas 75	Esparfloxacino	Macrófagos J774	*Mycobacterium avium - M. intracellulare*	Concentración del fármaco en hígado y bazo
Liposomas pegilados 76	Isoniazida Rifampicina	Ratón	*Mycobacterium tuberculosis*	• Liberación controlada del fármaco • Reducción de la toxicidad del fármaco
Liposomas	Claritromicina	Ratón	*M. avium*	Inhibición del crecimiento de la bacteria en el modelo de tuberculosis experimental
Liposomas 77	Ciprofloxacino o			
Dextrano manosilado 78	Norfloxacino	Ratón	*Mycobacterium bovis*	Reducción del número de UFCs en los pulmones de los ratones infectados

UFCs: Unidades formadoras de colonias.

Por todo ello, en los últimos años se están haciendo grandes esfuerzos para desarrollar liposomas y nanopartículas para la administración pulmonar mediante inhalación de antibióticos (80-82); aunque quedan algunos problemas por resolver como la deposición homogénea en los pulmones de la formulación inhalada.

Salmonelosis

Las bacterias del género Salmonella son parásitos intracelulares facultativos y causan salmonelosis y fiebres tifoideas. Los antibióticos efectivos contra este tipo de bacterias presentan baja penetración celular y diferentes efectos secundarios.

Ampicilina encapsulada en liposomas fue más efectiva que el fármaco libre en un modelo ratón utilizando *Salmonella typhimurium* (83). A dosis única de ampicilina (0,8 mg) encapsulada en liposomas se obtuvo una tasa de protección del 60% de los ratones durante 2 meses. La administración de 3 dosis de

0,8 mg de ampicilina liposomal fue ligeramente más efectiva. Este incremento en la eficacia terapéutica de la ampicilina liposomal se atribuyó a la concentración del antibiótico en las células del sistema monocito-macrofágico tras su administración por vía intravenosa. Sin embargo, cualquiera que fuese la dosis, los tratamientos no eliminaban por completo la presencia de bacterias en hígado o bazo, quedando aproximadamente 102 UFC/órgano en los ratones supervivientes. En otro interesante trabajo, la encapsulación de ampicilina en nanopartículas de poli(isobutilcianoacrilato) aumentó alrededor de 120 veces la eficacia del antibiótico en el modelo anterior de infección experimental aguda de *Salmonella typhimurium* de ratón. En este caso, el 100% de los ratones tratados con una única dosis de nanopartículas sobrevivió, mientras que los animales no tratados morían tras 10 días. Esta elevada actividad fue explicada por una completa esterilización de los órganos donde la bacteria intracelular se localizaba (83-85). Aunque no existe un gran número de experiencias en las cuales se hayan realizado una comparativa de la eficacia ofertada por los diferentes sistemas submicrónicos, las nanopartículas parecen más eficaces que los niosomas y, estos a su vez, más eficientes que los liposomas (86). Esta superioridad de las nanopartículas puede ser explicada por su mayor estabilidad en los medios biológicos.

En otro trabajo también se demostró la eficacia de liposomas para incluir estreptomicina y tratar infecciones por *Salmonella enteritidis* (87), utilizando ratones C57BL/6. En este modelo estos liposomas suprimieron la multiplicación bacteriana y prolongaron la tasa de supervivencia de los animales hasta 55 días tras la administración de solamente dos dosis.

Por otra parte, liposomas de gentamicina fueron adecuados para tratar de manera satisfactoria infecciones diseminadas de Salmonella dublin en ratones BALB/c (88). En este caso, todos los animales sobrevivieron tras una única administración de 20 mg gentamicina/kg, mientras que la misma dosis del fármaco libre era totalmente ineficaz. Además, los bazos se encontraron «estériles», aunque un pequeño número de bacterias viables se pudo cuantificar en los nódulos linfáticos mesentéricos y en placas de Peyer. En un estudio parecido, gentamicina liposomal a una dosis de 10 mg/kg mostró una elevada eficiencia profiláctica y una gran actividad terapéutica en una infección experimental con *Salmonella typhimurium* en un modelo murino (89).

La eficacia de liposomas encapsulando ciprofloxacino fue estudiado en ratones BALB/c infectados con *Salmonella Dublín* (90). El tratamiento con ciprofloxacino liposomal disminuía el número de bacterias viables en bazo, nódulos linfáticos y placas de Peyer, indicando que el antibiótico se distribuía a todas las áreas de inflamación y no solamente a los órganos principales del sis-

tema retículoendotelial. En una infección sistémica de *Salmonella typhimurium* en ratones, ciprofloxacino liposomal administrado a 20 mg/kg disminuía entre 3 y 4 logaritmos el número de bacterias viables en hígado y bazo (91). Igualmente se observaba una reducción del número de bacterias en pulmón y riñón. Cuando la formulación era administrada por vía pulmonar, la retención de ciprofloxacino en este órgano era también significativamente mayor (91).

Listeriosis

Lysteria monocytogenes es un parásito intracelular facultativo capaz de causar meningitis y septicemia. La encapsulación de ampicilina en liposomas multiplicó por 90 su eficacia en ratones infectados con *Leysteria monocytogenes* (92). Este fenómeno es debido a que la ampicilina liposomal disminuye la supervivencia de este patógeno en macrófagos peritoneales de ratón; aunque, la tasa de actividad es dependiente de la composición de estos sistemas lipídicos (93). Por otra parte, en este caso también, nanopartículas conteniendo ampicilina se mostraron más eficientes que los liposomas para el tratamiento de listeriosis en un modelo de infección crónica de ratones con *Listeria monocytogenes* (94). En este caso, se mostró que el bazo no fue totalmente esterilizado, y que ocurrían reinfecciones al cabo de varios días tras la supresión del tratamiento. En este modelo, la reinfección fue explicada por la presencia de bacterias en estadio de no división; aunque, en este mismo modelo, la administración de nanopartículas conteniendo ciprofloxacino (fluoroquinolona activa frente a bacterias en fase de división y en reposo), no pudieron erradicar por completo el reservorio de bacterias (95).

Brucelosis

La brucelosis es una zoonosis transmisible a los humanos tras contacto con animales infectados. En principio, dado que Brucella spp. se localiza intracelularmente y que los antibióticos utilizados tienen una baja eficacia, los tratamientos son bastante largos y las recaídas son también bastante frecuentes.

Los liposomas han demostrado ser adecuados sistemas para la administración de gentamicina y estreptomicina. Así, dos inyecciones intraperitoneales de estas formulaciones mostraron su efectividad en ratones y cobayas infectados con Brucella spp., no detectándose bacterias viables en el hígado, bazo, pulmones o riñones diez días después de la infección (96). En otro interesante traba-

jo, gentamicina encapsulada en liposomas cargados positivamente demostraron una gran eficacia en reducir el número de bacterias viables de *Brucella melitensis* residentes en el hígado y bazo de ratones infectados. Por el contrario, liposomas cargados negativamente fueron mucho menos eficaces en el tratamiento de la misma infección (97). Estos resultados fueron confirmados por Vitas y colaboradores en un estudio en el cual, utilizando gentamicina encapsulada en liposomas catiónicos, aumentaron la actividad del antibiótico en ratones infectados con *Brucella abortus* ofreciendo hasta un 70% de protección (98, 99).

Más recientemente, partículas de PLA y de PLGA conteniendo gentamicina mostraron una muy buena actividad frente a un modelo de brucelosis experimental en ratones (100-103). En realidad, las partículas de PLGA conteniendo gentamicina se acumulan en los macrófagos y muestran una distribución selectiva en el hígado y el bazo de ratones infectados.

Se ha demostrado también la capacidad de dendrímeros manosilados para la liberación pH específica de rifampicina en macrófagos alveolares de rata (104).

Otras infecciones bacterianas

La Tabla 10.3 recoge otros estudios relacionados con la aplicación de nanotecnologías en el tratamiento de diferentes infecciones bacterianas.

Las formulaciones submicrónicas de antibióticos también han demostrado un importante interés para la administración local de antibióticos y para la liberación controlada de los mismos en el lugar de infección. Así se ha propuesto la utilización de estas formulaciones en la profilaxis de heridas quirúrgicas (113, 114), o en el tratamiento de infecciones oculares como queratitis o endoftalmitis (115-118). Recientemente, unas partículas bioerosionables de sulfato cálcico conteniendo nanopartículas de hidroxiapatita han sido propuestas como material para la administración local y sostenida de antibióticos en infecciones óseas (119). En este sistema, las nanopartículas de hidroxiapatita modifican las propiedades del material permitiendo liberación total de la dosis del antibiótico incorporado. Por otra parte, la tolerancia del material modificado por las nanopartículas aumenta al reducirse la cantidad de ácido producido por la disolución del sulfato cálcico, reduciéndose la respuesta inflamatoria. Este es un buen ejemplo de cómo las nanotecnologías pueden aportar ventajas importantes a otras tecnologías ya disponibles, como puede ser la de producción de materiales para implantación.

TABLA 10.3. *Ejemplos de utilización de nanotecnologías en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias.*

Formulación Referencia	Fármaco	Modelo	Infección experimental	Resultado
Liposomas 105	Penicilina	*In vitro*	—	Inhibición del crecimiento de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis* y *Escherichia coli*
Liposomas 106	Netilmicina	Ratón	*Escherichia coli*	Aumento de la actividad farmacológica, profiláctica y terapéutica, en modelo experimental
Liposomas 107	Amikacina	Ratón	*Mycobacterium avium - M. intracellulare*	Niveles de antibiótico en hígado y pulmón durante 28 días
Nanopartículas de gliadina 108	Amoxicilina	Jerbo de Mongolia	*Helicobacter pylori*	Eliminación eficiente infección experimental por *H. pylori* debido a su capacidad mucoadhesiva
Bacteriofagos (PhagoBio Derm) 109	Ciprofloxacino		Pacientes con heridas infectadas por *S. aureus* resistentes	Eliminación de la infección
Nanopartículas PLGA 110	Gentamicina	Ratón	*Brucella melitensis*	
Nanopartículas PLGA 111	Ciprofloxacino	Ratón	*Escherichia coli*	Inhibición efectiva crecimiento bacteriano debido a las características de liberación sostenida desde las nanopartículas
Micelas poliméricas (colesterol - PEG - TAT)	Ciprofloxacino	Rata	—	Micelas capaces de atravesar la barrera hematoencefálica

PLGA: poli(láctico-co-glicólico); PEG: polietilenglicol; TAT: péptido activador (NH2-YGRKKRRQRRR); GEN: gentamicina.

Infecciones virales

Las infecciones víricas son, probablemente, las más difíciles a tratar y se están realizando grandes esfuerzos en la búsqueda de nuevas moléculas y nuevas estrategias para desarrollar terapias efectivas. En la actualidad, las estrategias innovadoras más prometedoras pasan por la utilización de oligonucleótidos antisentido (120-125). La terapia antisentido constituye una alternativa general

a todos los demás tratamientos antivirales que existen para las principales infecciones virales en humanos: HIV, citomegalovirus, virus de la hepatitis C, y el virus respiratorio sincitial.

Infecciones por citomegalovirus

El citomegalovirus humano (CMVH) es un virus altamente especie-específico (126). En los países desarrollados, la prevalencia aumenta desde la infancia y un 10-20% de los niños se infectan antes de llegar a la pubertad. En adultos, la seroprevalencia oscila entre el 10 y el 40%. CMVH raramente causa enfermedad en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, puede causar mortalidad severa en neonatos y en individuos inmunocomprometidos, principalmente en pacientes transplantados y enfermos de SIDA (127). Así, entre un 15-40% de los infectados por VIH sufren retinitis uni- o bilateral que sin un eficaz tratamiento causa ceguera (128). Igualmente, la mortalidad por neumonía causada por CMVH puede alcanzar hasta el 40% en pacientes transplantados de médula (129).

Para el tratamiento local de infecciones por citomegalovirus y para su administración en el ojo, algunos antivirales (como aciclovir y ganciclovir) han sido asociados a nanopartículas. Así nanoesferas convencionales y pegiladas de PLA conteniendo aciclovir fueron capaces de aumentar los niveles del antiviral en el humor acuoso, tras su administración bajo forma de instilación oftálmica en conejos. Sin embargo, las nanoesferas pegiladas eran mucho mejor toleradas que las convencionales y su eficacia era también sensiblemente mayor (130). En un trabajo similar, la pegilación de nanopartículas de poli(alquilcianoacrilatos) aumento la tolerancia ocular de estos sistemas (131).

En otro trabajo, se utilizaron nanopartículas de albúmina para la administración intravitrea de ganciclovir (132). El ganciclovir (GCV) se considera el fármaco de primera elección en el tratamiento de afecciones graves por CMVH. Este principio activo previene la replicación del ADN viral pero no elimina el virus del tejido. Cuando ganciclovir es administrado por vía intravenosa, los niveles que se alcanzan en el vítreo son relativamente bajos, por lo que se hace necesario administraciones repetidas y dosis altas. Con el fin de evitar este problema, se propuso la administración local intravítrea para el tratamiento de retinitis causadas por HCMV (133). Sin embargo, en el vítreo, ganciclovir presenta un aclaramiento elevado y su tiempo medio de residencia es bajo, lo que hace necesario inyecciones frecuentes para mantener los niveles de fármaco en

el rango terapéutico. Esas administraciones continuas y repetidas tienen el riesgo de inducir la aparición de cataratas, desprendimientos de retina y hemorragias (134). Una posible alternativa para facilitar la eficacia y la aceptación del tratamiento por parte del paciente puede ser el uso de nanopartículas como sistemas reservorios de tipo implante matricial a inyectar en el vítreo. Estos, por su pequeño tamaño, minimizarán la alteración de la visión que producen sistemas implantables de mayor tamaño. Por otra parte, la albúmina es una proteína biodegradable que puede asociarse a un gran número de fármacos de naturaleza hidrofílica de forma no específica. Además, las técnicas para la preparación de nanopartículas de albúmina son relativamente sencillas y no es necesario recurrir al uso de disolventes orgánicos ni reactivos tóxicos. Finalmente, estos sistemas deberían permitir una liberación prolongada del fármaco encapsulado y su acceso al núcleo celular (132, 135).

La actividad antiviral de estas nanopartículas de albúmina conteniendo ganciclovir se determinó en fibroblastos de estroma de cornea humanos y fibroblastos embrionarios de pulmón humano (MRC-5) mediante las técnicas de la formación de placas y de la expresión de los antígenos del periodo precoz (136). En fibroblastos MRC-5 infectados, la formulación de nanopartículas era 3 veces más activa que la solución acuosa del antiviral, con una IC50 de 0,4 μM. Cuando las células eran tratadas con las formulaciones 48 horas después de su infección, la actividad de las mismas aumentaba significativamente en comparición con el tratamiento a tiempo 0. Todos estos resultados se correlacionaron con la capacidad de las nanopartículas de albúmina para vehiculizar el fármaco al interior de la célula infectada (132).

Recientemente, la terapia antisentido está tomando cuerpo como una alternativa a las carencias terapéuticas de la terapia antiviral tradicional. El primer oligonucleótido antisentido comercializado fue Vitravene®, para el tratamiento de infecciones por citomegalovirus en pacientes infectados por HIV. Vitravene® se administra en solución acuosa por vía intravítrea. Sin embargo, la pobre estabilidad de los oligonucleótidos y su baja capacidad para atravesar las membranas celulares impone pautas de dosificación basadas en administraciones frecuentes y repetidas que pueden ser peligrosas y dañar de forma irreversible el ojo. Por ello, tanto liposomas como nanopartículas han sido propuestos como sistemas de liberación sostenida capaces de ofrecer tratamientos más aceptables desde el punto de vista del paciente (124, 137, 138).

Uno de los primeros trabajos en este sentido, fue la utilización de nanopartículas de albúmina como vehículos para este tipo de moléculas biológicamente activas. En cultivos celulares de fibroblastos infectados con citomegalo-

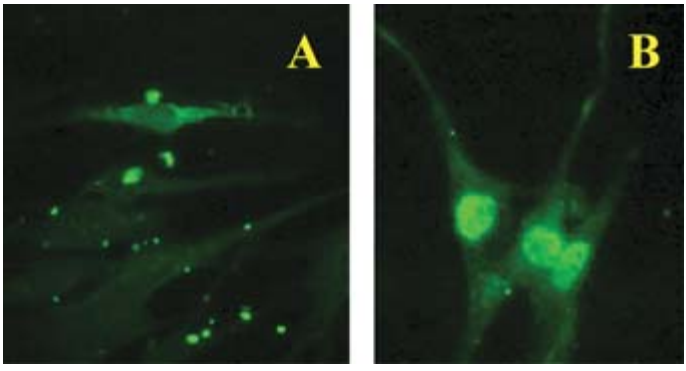


FIGURA 10.2. *Perfil de distribución celular de un oligonucleótido antisentido libre (A) o encapsulado en nanopartículas de albúmina (B) en células MRC-5. Las células fueron incubadas con 5 □M del oligonucleótido durante 24 h a 37 ºC.*

virus humano, la formulación control del oligonucleótido antisentido (PO) mostró una actividad antiviral baja. Así, a una concentración de 10 □M, la eficacia del tratamiento fue solo de un 20%. Por el contrario, las formulaciones de nanopartículas de albúmina aumentaban de manera significativa la actividad antiviral del oligonucleótido y su IC50 se encontraba cerca de 10 □M (135). Con el fin de tener una idea más aproximada de la eficacia de las nanopartículas, se investigó su influencia en la internalización del oligonucleótido marcado fluorescentemente. Para PO, su distribución en las células mostraba una distribución perinuclear correspondiente a su acumulación en compartimentos vesiculares como los endosomas y/o lisosomas, sin acumulación nuclear detectable (Figura 10.2A). Además, la fluorescencia asociada a las células disminuía muy significativamente al bajar la temperatura, indicando que la captación del oligonucleótido por las células es un mecanismo de endocitosis dependiente de energía. Por el contrario, las nanopartículas de albúmina fueron capaces de transferir el oligonucleótido al núcleo de las células (Figura 10.2B) (138). Estos resultados confirmaban que las nanopartículas de albúmina tienen propiedades fusogénicas que permiten el escape endosomal de los oligonucleótidos y su distribución nuclear.

Por otra parte, la inyección intravitrea de estas nanopartículas de albúmina en rata demostró que estos sistemas eran bien tolerados (139). Dos semanas después de la administración se observó como una cantidad significativa de las mismas se localizaba todavía en la cavidad vítrea, principalmente en una fina capa que recubría parte de la retina, en sitios adyacentes a los vasos sanguíneos, en el iris y en el cuerpo ciliar. En ningún caso se obtuvieron evidencias de pre-

sencia de nanopartículas en las capas interiores de la retina (células responsables de la visión y en el área neuronal). Además, se pudo confirmar la ausencia de alteraciones en los tres principales autoantígenos inductores de uveoretinitis autoinmune experimental (arrestina, rodopsina e IRPB) que induce un daño considerable en la retina y en los tejidos adyacentes.

La encapsulación de estavudina (d4T) en diferentes tipos de liposomas, aumentó en todos los casos la penetración del fármaco en macrófagos humanos (147). La forma fosforilada de dideoxicitidina (ddCTPP) en liposomas redujo la infección en bazo y médula ósea en ratones infectados, disminuyendo los signos clínicos de la infección, pero sin modificar los parámetros sanguíneos (148). Igualmente, la encapsulación de zalcitabina y saquinabir en nanopartículas permite concentraciones elevadas de ambos fármacos en macrófagos humanos infectados. Sin embargo, en el caso de zalcitabina, no se observaron mejoras significativas al comparar con el fármaco libre (149).

La fijación de ligandos como sCD4 y CD4-IgG en la superficie de liposomas aumenta de forma selectiva la capacidad de estos nanosistemas para alcanzar los macrófagos infectados (121, 150). Con estos sistemas «pilotados» se ha demostrado un aumento de 10 veces en la eficacia del antiviral, disminuyendo en paralelo los efectos tóxicos.

De igual forma se ha visto que la utilización de liposomas pH sensibles permite mejorar la selectividad y la eficacia de los oligonucleótidos antisentido en su capacidad para inhibir la replicación del virus en macrófagos infectados por el VIH 50LTR (151). Sin embargo, hasta la fecha no existe demostración concluyente que la terapia antisentido es capaz de controlar las infecciones virales in vivo. Esto es parcialmente debido a que sensibilidad al pH de este tipo de liposomas se ve fuertemente afectada al entrar en contacto con la sangre. Por ello, y con el fin de incrementar la estabilidad de estos vehículos, parece preferible la utilización de nanopartículas poliméricas. Aunque, hasta la fecha, pocos trabajos han sido publicados, si se ha podido comprobar que las nanopartículas de PLGA permiten aumentar la captura intracelular de los oligonucleótidos antisentido en células infectadas por VIH-1, reduciendo de manera sensible su actividad viral (152).

Otro tipo de vehículos que puede ser interesante para controlar las infecciones virales son los liposomas fusogénicos (153, 154). Recientemente, se ha propuesto un sistema innovador formado por la combinación de liposomas fusogénicos y nanopartículas cargadas con un oligonucleótido (155). En este sistema, los liposomas fusogénicos facilitarían la entrada de las nanopartículas al

citoplasma celular. Una vez en el interior de la célula, las nanopartículas liberarían de forma controlada el oligonucleótido, actuando como reservorio intracelular del oligonucleótido y prolongando su acción en el lugar de acción. El sistema se ha mostrado particularmente interesante para conseguir una regulación prolongada de la expresión de un determinado gen en la célula.

Otro desafío importante en la terapia antirretroviral es el aumento de la estabilidad y de la solubilidad de estos fármacos en el tracto gastrointestinal. Por otra parte, se ha comprobado que el VIH es activo en el tejido linfoide asociado a mucosas en el cual las células inmunocompetentes son un importante «target» para el virus durante el periodo clínico de latencia. En este contexto, la incorporación de azidotimidina (AZT) en nanopartículas de poli(alquilcianoacrilatos) aumentó la estabilidad de este fármaco en los fluidos digestivos (156). Para saquinavir, su asociación previa con ciclodextrinas y posterior encapsulación en nanopartículas de poli(alquilcianoacrilato) ha sido sugerido como una estrategia para resolver su baja biodisponibilidad (157). Aparte de aumentar la solubilidad acuosa del fármaco, esta estrategia permite al fármaco evitar el efecto de la P-glicoproteína intestinal y el metabolismo hepático presistémico, principales responsables de su baja biodisponibilidad oral. Por último, la incorporación de saquinavir en este tipo de nanopartículas era también beneficioso para promover la captura intracelular del fármaco en macrófagos infectados por VIH reduciendo drásticamente su actividad antiviral y potenciando enormemente la eficacia del fármaco libre (149).

Por otra parte, nanopartículas pH-sensibles han demostrado también su eficacia para aumentar la biodisponibilidad oral de un nuevo inhibidor de la proteasa de características lipófilas (CPG 70726). Se probaron distintos tipos de nanopartículas a base de PLA y de copolímeros del ácido metacrílico (Eudragit® L y Eudragit® S). Cuando las nanopartículas se administraron por vía oral a perros Beagle, solamente las nanopartículas a base de Eudragit L permitieron niveles plasmáticos adecuados del fármaco (158).

Otros tratamientos antivirales

La limitación principal del uso de compuestos antivirales de bajo peso molecular reside en la aparición rápida de resistencia viral. Por ello, hoy en día se están intentando aplicar otras estrategias basadas en la estimulación de las defensas naturales del huésped mediante la utilización de interferones combinado con fármacos de síntesis orgánica. Sin embargo, no todos los pacientes responden adecuadamente a esta terapia (159-162). Aparentemente, buenos resultados

se han conseguido mediante la encapsulación de interferón en liposomas (159) y en nanopartículas de albúmina (163). La aplicación de la nanotecnología a la terapia antiviral esta todavía en su infancia. Los pocos datos que ya se disponen en células infectadas son esperanzadores y permiten sospechar que esta estrategia puede tener un futuro muy brillante.

APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN ENFERMEDADES METABÓLICAS

Las enfermedades metabólicas incluyen algunos de las principales amenazas para la salud pública mundial. La diabetes afecta a decenas de millones de personas en el mundo (164) y la osteoporosis es la enfermedad metabólica más prevalente.

El tratamiento de enfermedades metabólicas requiere la administración de proteínas o péptidos para paliar estos desórdenes metabólicos. En el caso de la diabetes, las inyecciones diarias de insulina están basadas en la autorregulación de los niveles sanguíneos de glucosa, combinado con un régimen de dieta y ejercicio (165, 166). Desde un punto de vista general, todos estos tratamientos basados en la administración parenteral diaria de la dosis adecuada son engorrosos y poco aceptados por los pacientes, lo cual puede limitar su eficacia (166, 167). Para favorecer la aceptación del tratamiento por parte de los pacientes, diferentes estrategias destinadas a conseguir niveles más sostenidos de estas macromoléculas han sido objeto de intensas investigaciones (168, 169). Entre ellas, el desarrollo de vehículos o formas farmacéuticas capaces de permitir la absorción y regular la liberación de estas macromoléculas a través de las mucosas oral, nasal o pulmonar también han sido (y son) objeto de trabajo intenso. En el caso de la insulina, la formulación oral debería permitir que la hormona accediera directamente al hígado por la vena porta. Esto sería una gran ventaja ya que éste camino mimetizaría su tráfico fisiológico cuando es secretada por el páncreas en individuos sanos (170). Sin embargo, las rutas de administración a través de mucosas siguen siendo un reto importante para la administración de péptidos y proteínas, ya que estas macromoléculas hidrofílicas son incapaces de atravesar las barreras mucosales por ellas mismas y son degradadas una vez alcanzado el torrente circulatorio.

Con el fin de solucionar estos problemas y favorecer la absorción de estas macromoléculas a través de las mucosas del organismo, diferentes estrategias basadas en la nanotecnología han sido propuestas. Aunque ya en 1976 se utilizaron liposomas para administrar insulina a través del tracto gastrointestinal

(171, 172), los resultados obtenidos han sido en general decepcionantes debido a la falta de estabilidad de estos vehículos en los fluidos digestivos. Por otra parte, el uso de nanopartículas poliméricas para la administración de este tipo de macromoléculas fue propuesto en 1980 (173) y, desde entonces, numerosos sistemas submicrónicos han sido ensayados con resultados dispares (174-180).

De todas formas, lo que sí parece cierto es que la capacidad adhesiva de las nanopartículas es uno de los factores clave que determina la absorción y la biodisponibilidad de estas macromoléculas cuando son administrados a través de mucosas. En realidad, el desarrollo de interacciones bioadhesivas favorece el «anclaje» de las nanopartículas en contacto íntimo con la mucosa. Este fenómeno aumentaría el tiempo de residencia de las nanopartículas en el lugar de absorción o de acción del fármaco, favoreciendo el establecimiento de un gradiente de concentración desde el reservorio (nanopartícula) hasta la circulación sanguínea (181, 182).

Otro fenómeno que parece influir en la absorción de macromoléculas a través de las mucosas del organismo es el de la «traslocación» de las nanopartículas. Este fenómeno de absorción es dependiente de la naturaleza de los vehículos. Las nanopartículas de poli(alquilcianoacrilatos) son absorbidas intactas a través del epitelio intestinal normal, mientras que sufren una intensa degradación en la vecindad de las células M de las placas de Peyer (183). Para otros tipos de nanopartículas biodegradables, no se tienen datos concretos sobre su comportamiento; aunque, se ha descrito que serían principalmente absorbidas por las placas de Peyer (184-186). La Figura 10.3 muestra el comportamiento general de las nanopartículas poliméricas en el tracto gastrointestinal y las posibles vías para su absorción a través de las mucosas del organismo. En cualquier caso, este fenómeno de absorción no está completamente elucidado y una gran cantidad de trabajo experimental tiene que ser todavía realizado para llegar a comprender mejor esta «traslocación». Igualmente, menos información esta disponible sobre el devenir de las nanopartículas una vez que han sido absorbidas por la mucosa. De nuevo, utilizando nanocápsulas de insulina se ha visto que estos vehículos alcanzan los vasos sanguíneos de la mucosa. Sin embargo, no hay datos concluyentes sobre si estas nanocápsulas serían capaces de alcanzar otros órganos del organismo o, por el contrario serían degradadas en los vasos sanguíneos que irrigan la mucosa (183, 187).

Recientemente, la administración oral en ratas de nanopartículas de quitosano conteniendo un plásmido que codifica para la luciferasa (pX2-Luc) indujo una importante transfección de las células del intestino delgado (188). Dicho fenómeno puedo corroborarse con la utilización de otro plásmido codificando

para la proteína fluorescente verde (pEGFP-N1) que también permitió confirmar que la expresión de las proteínas tenía lugar únicamente en el intestino delgado. Allí, durante 3 días, se pudo monitorizar por luminiscencia (mediante una cámara CDD) la expresión de dicha proteína (188). Durante este periodo, la expresión de luciferasa fue disminuyendo con el tiempo hasta desaparecer a las 72 horas. Este resultado estaría determinado por la vida media de los enterocitos en rata que es del mismo orden a la expresión observada (189).

Tratamiento de la diabetes

La insulina es una proteína de 51 aminoácidos y con una masa molecular de 6.000. Esta proteína es el sostén principal de los pacientes con Diabetes Mellitus insulino dependientes o Diabetes tipo I (190). La enfermedad está principalmente causada por una destrucción «autoinmune» de la insulina que se secreta en las células beta del páncreas (191). Los pacientes no pueden utilizar la glucosa de forma apropiada y presentan niveles altos de este azúcar en sangre (hiperglucemia) mientras que los niveles intracelulares de glucosa son bajos (192). Por otra parte, la administración oral de insulina es totalmente ineficaz para disminuir la glucemia (193). Con el fin de aumentar la biodisponibilidad

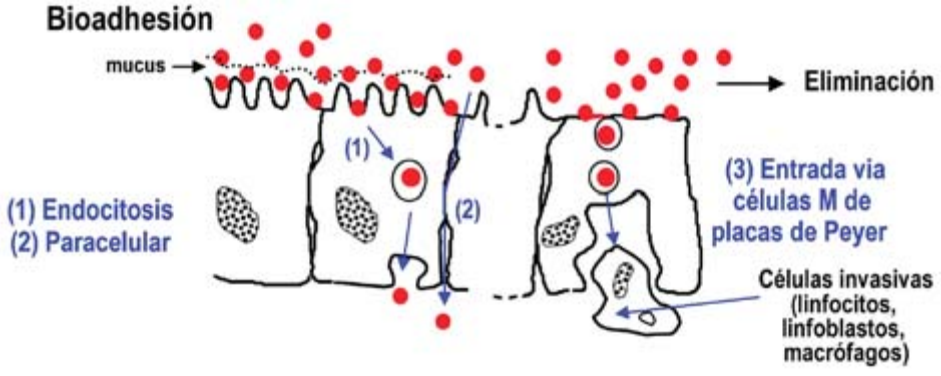


FIGURA 10.3. *Representación esquemática del posible comportamiento de las nanopartículas poliméricas en la mucosa gastrointestinal tras su administración oral. Las nanopartículas serían capaces de desarrollar interacciones bioadhesivas con componentes de la mucosa. Esto aumentaría el tiempo de residencia de la forma farmacéutica en contacto con la mucosa y el establecimiento de un gradiente de concentración de la molécula biológicamente activa desde el reservorio (nanopartícula) hacia el epitelio, favoreciendo su absorción. En paralelo o con posterioridad, las nanopartículas (en función de su naturaleza) podrían ser capaces de atravesar dicha mucosa por alguno de los siguientes mecanismos: endocitosis a través de los enterocitos, entrada paracelular y/o absorción vía las células M de las placas de Peyer.*

oral de insulina, numerosos trabajos han demostrado el potencial de las nanopartículas, incluyendo nanoesferas convencionales, pegiladas o asociadas a diferentes tipos de ligandos. La Tabla 10.4 recoge algunos ejemplos representativos de nanotecnologías aplicadas a la administración oral de insulina.

El primer estudio destinado a la evaluación de nanopartículas poliméricas como vehículos para la administración oral de insulina en ratas diabéticas fue realizado por Couvreur y colaboradores en 1980 (173). En este caso, la insulina se incorporó por adsorción física a la superficie de nanopartículas de poli(alquilcianoacrilato) de 220 nm. Desgraciadamente no se observó una disminución de los niveles plasmáticos de glucosa en las ratas diabéticas; aunque, la insulina seguía siendo activa tras administración subcutánea. Este resultado sugiere que el péptido no estaba protegido de su degradación proteolítica en el tracto gastrointestinal.

Más tarde, diferentes formulaciones han sido desarrolladas con el fin de encapsular insulina en el núcleo de las nanoesferas y, así, minimizar la rápida degradación de esta proteína. Así, la insulina fue encapsulada en nanocápsulas de PIBCA conteniendo Miglyol 812 (194). Tras su administración oral en ratas diabéticas, y dependiendo de la dosis administrada (12-50 UI/kg), la glucemia disminuyó de manera importante desde el segundo día tras su administración manteniéndose baja durante al menos una semana (194). En otro estudio posterior, la administración oral de 100 UI/kg de insulina encapsulada permitió reducir la glucemia en un 25% durante 6 días (207). En otros estudios llevados a cabo por el mismo grupo, se observó y cuantificó una disminución importante de otras disfunciones pancreáticas (hiperglucagonemia e hipersomatostatinemia) tras la administración intragástrica de insulina encapsulada en nanocápsulas, tanto en un modelo de rata diabética inducida con aloxano como en perros (195, 208).

En un trabajo similar, la dispersión de nanoesferas de PIBCA conteniendo insulina en Miglyol 810 provocó un importante descenso en la glucemia de los animales desde la segunda hora hasta al menos 10 días tras la administración de una única dosis de la macromolécula, con un mínimo de glucosa en sangre a las 48 horas. Sin embargo, estos efectos eran más cortos (2 días) o nulos si las nanoesferas se dispersaban en un medio acuoso conteniendo o no tensioactivos (196). En un trabajo más reciente, Hou y colaboradores han confirmado la influencia del vehículo oleoso en el incremento del efecto de la insulina encapsulada en estas nanopartículas. En este trabajo, la biodisponibilidad aparente de la formulación de insulina en las nanopartículas de PIBCA (50 UI/kg) fue del 22% cuando se dispersó la formulación en una solución oleosa (aceite de soja, Tween 20 y vitamina E) y del 15,5% cuando se dispersaba en un medio acuoso (197). Esta mayor

TABLA 10.4. *Ejemplos representativos de las nanopartículas empleadas para la administración oral de insulina.*

Formulación Referencia	Propiedades	Modelo animal/dosis	Resultados
Nanocápsulas PIBCA 194	220 nm EE: 55%	STZ-rata diabética 12-50 UI/kg	Efecto hipoglucemiante intenso y duradero (2.º día hasta 1-3 semanas)
NP PIBCA 195	145 nm 1 UI/mg polímero	STZ-rata diabética 100 IU/kg	Para insulina humana NP dispersadas en agua: no efecto NP dispersadas en tensioactivos: efecto hipoglucémico prolongado (desde la 2.ª h hasta 48 h) NP dispersadas en aceite: efecto hipoglucémico muy duradero (hasta 2 semanas)
NP PIBCA 196	85 nm EE: 60%	STZ-rata diabética 50 UI/kg	Para insulina humana, efecto hipoglucemiante durante al menos 40 h
NP PIBCA 197	—	STZ-rata diabética 50 UI/kg	Cuando NP dispersadas en agua: F_R del 15% Cuando NP dispersadas en aceite: F_R del 22%
NP PLGA NP PLGA-FAO-Fe 198	< 5 mm	Rata 19 UI/kg	Con insulina bovina: F_R para PLGA-NP: 1,7% F_R para PLGA-FAO-NP: 11,4%
NP PLGA 199	146 nm EE: 88,5%	STZ-rata diabética 20 UI/kg	Con complejo insulina-fosfolípido, el F_R fue del 7,7%
NP PLGA 200	150 nm 26 mg/mg	STZ-rata diabética 20 UI/kg	Con insulina porcina: F_R del 3,7% para PLGA NP F_R del 6,3% para PLGA-HP55 NP
NP PLGA-HP55	169 nm 32 mg/mg		
NP quitosano 201	270-340 nm EA: 39-79%	STZ-rata diabética 50-100 UI/kg	Con insulina porcina: EF del 4,4% (50 UI/kg) y 3,5% (100 UI/kg)
NP quitosano 202:203	290 nm 95 mg/mg	Aloxano-rata diabética 7-21 IU/kg	Para una dosis de 21 UI/kg, la hipoglucemia se prolongó durante al menos 15 h y EF fue 14,9%.
NP Quitosano-PGA 193	197 nm 15 mg/mg	STZ-rata diabética 15-30 UI/kg	Con insulina bovina, disminución importante de los niveles plasmáticos de glucosa durante al menos 10 h

TABLA 10.4. *Ejemplos representativos de las nanopartículas empleadas para la administración oral de insulina.* (Continuación)

Formulación Referencia	Propiedades	Modelo animal/dosis	Resultados
NP lipídicas sólidas 204	60 nm EE: 40% 50 UI/kg	STZ-rata diabética	Para NP lipídicas sólidas: F_R = 5% Para WGA-NP lipídicas sólidas: F_R = 7,1%
WGA-NP lipídicas sólidas	70 nm EE: 40%		
Vitamina B12-NP dextrano 205	160-250 nm 10-28 g/mg	STZ-rata diabética 20 UI/kg	Para insulina humana, EF fue 2,6 veces mayor que para nanopartículas convencionales (26,5% vs 10,3%)
NP PEC-Eudragit RS 206	360 nm EE: 96%	STZ-rata diabética 25-100 UI/kg	Para insulina humana, efecto hipoglucémico dosis dependiente. A 100 UI/kg, F_R del 13%.

NP: nanopartículas; PIBCA: poli(isobutil-2-cianoacrilato); PLGA: poli(láctico-co-glicólico); FAO: oligómero de anhídrido fumárico; Fe: tetraóxido de hierro; HP55: phtalato de celulosa; PGA: ácido poli(glutámico); WGA: lectina de germen de trigo; PEC: poli(épsilon-caprolactona); EA: eficacia de asociación (%); EE: eficacia de encapsulación (%); STZ: estreptozotocina; F_R: biodisponibilidad relativa; EF: eficacia farmacológica; PIBCA: poli(isobutil-2-cianoacrilato).

absorción de la insulina cuando las nanopartículas se dispersan en medios oleosos fue confirmada por Watnasirichaikul y colaboradores (209). En este caso, la dispersión de estas nanopartículas en una microemulsión (conteniendo mono- di- y triglicéridos de cadena media, polisorbato 80 y monooleato de sorbitano) dio lugar a una mayor reducción de los niveles sanguíneos de glucosa en ratas diabéticas que la administración de una solución acuosa de insulina o que la administración de insulina libre dispersada en la misma microemulsión.

Otro resultado interesante es que las formulaciones de insulina en nanopartículas de poli(alquilcianoacrilatos) se han mostrado eficaces para paliar la enfermedad en un modelo de ratón diabético y no obeso que mimetiza la diabetes tipo 1 humana (210). Así, la administración oral de una dosis semanal de insulina encapsulada en nanocápsulas de PIBCA (100 UI/kg) redujo la incidencia de diabetes (38% vs. 75% para el control), retrasó el inicio de la enfermedad y disminuyó la severidad de la inflamación linfocitaria de los islotes endógenos. Aunque el tratamiento oral fue parado a los 300 días de edad de los animales, la incidencia de diabetes a día 360 seguía siendo bajo en los ratones tratados con estas nanocápsulas de insulina por vía oral (210).

Todos estos resultados muestran claramente que la encapsulación de insulina en nanopartículas de poli(alquilcianoacrilatos), en comparación con la ad-

sorción superficial de la proteína, es capaz de reducir la glucemia en ratas diabéticas. De la misma forma, la presencia de excipientes oleosos podría jugar un papel importante en la protección de la insulina y en su paso a través de la barrera intestinal (195, 211). De hecho, las nanopartículas no recubiertas tendrían una mayor capacidad para adherirse a la mucosa mediante algún mecanismo de bioadhesión. El desarrollo de interacciones bioadhesivas favorecería la formación de un depósito o reservorio de insulina en la mucosa intestinal, desde el cual la proteína sería liberada (195, 207, 208). Por otra parte, la presencia de contenidos oleosos (asociados a las nanopartículas) reduciría el vaciamiento gástrico y, así, se aumentaría el tiempo de residencia y las posibilidades para el desarrollo de interacciones bioadhesivas entre las nanopartículas y ciertos componentes de la mucosa gastrointestinal. En este contexto, mediante el uso de marcadores fluorescentes, Aboubakar y colaboradores demostraron que las nanocápsulas de insulina son capaces de depositarse a lo largo de la mucosa intestinal (212). Resultados similares fueron obtenidos por Pinto-Alphandary y colaboradores (183) usando insulina marcada con rojo Texas o las mismas nanocápsulas, conteniendo insulina, marcadas con oro coloidal.

Otro tipo de sistemas submicrónicos ampliamente utilizados para la administración oral de insulina son las nanopartículas a base de poli(ésteres). Así, Barichello y colaboradores (213) prepararon este tipo de nanopartículas en las cuales la insulina se encontraba de manera preferente unida a la superficie de las mismas. A pesar de esta mayoritaria adsorción, se observó un fuerte efecto hipoglucémico tras su administración en el íleo de los animales. Por otra parte, nanopartículas de PLGA han sido también utilizadas para encapsular un complejo entre insulina y fosfatidilcolina de soja (199). En un modelo de ratas diabéticas, estas nanopartículas inducían una importante reducción de los niveles plasmáticos de glucosa durante las primeras ocho horas, manteniendo el efecto durante más de 12 horas. En paralelo, la concentración sérica de insulina aumentaba gradualmente durante las primeras seis horas. La biodisponibilidad relativa de la insulina encapsulada en estas nanopartículas fue inferior al 8%, comparándola con una dosis subcutánea de insulina libre de 1 UI/kg, todavía lejos al límite inferior requerido para situaciones clínicas (superior al 15%).

En otro interesante trabajo, una formulación de nanopartículas formada por Fe_3O_4 (10%) y una mezcla de PLGA y oligómeros de acido fumárico (2:1) mostró una interesante actividad al ser administrada en ratas. Esta formulación mostró una eficacia superior al 11% de la que se obtuvo al administrar la misma dosis de insulina por vía intraperitoneal. Además, las nanopartículas fueron capaces de controlar los niveles de glucosa en plasma cuando se desafió a los animales

con una dosis de glucosa (198). Las autores suponen que varias propiedades de la formulación, incluyendo su capacidad bioadhesiva, contribuyen a la eficacia por vía oral. Así, los oligómeros de ácido fumárico y Fe_3O_4 potenciarían las propiedades bioadhesivas de las nanopartículas (214), permitiendo una mayor interacción entre estos vehículos y el epitelio intestinal. Por otra parte, el PLGA contribuiría a aumentar la estabilidad física de las nanopartículas resultants y a modular la liberación de insulina. De hecho, cuando la insulina se formula en sistemas a base de poli(anhídridos), como el copolímero de ácido fumárico y sebácico, no se observa un efecto hipoglucemiante. Esto sería debido a la rápida liberación de la proteína desde estos formulaciones. De forma similar, nanopartículas de PLGA fueron también ineficaces debido, probablemente, a su menor habilidad para desarrollar interacciones adhesivas dentro del tracto gastrointestinal (214).

Más recientemente, insulina porcina encapsulada en nanopartículas de PLGA recubiertas con phtalato de celulosa (recubrimiento entérico) dio lugar a una formulación que administrada en un modelo de ratas diabéticas indujo una efecto hipoglucemiante importante. Además esta formulación permitía una mayor absorción de insulina que cuando se formulaba en nanopartículas similares pero no recubiertas. Esto implica que el recubrimiento entérico ofrece una mayor protección a la insulina frente a su eventual degradación en las condiciones fisiológicas del estómago (200).

Por otra parte, también recientemente, se ha propuesto la utilización de nanopartículas de poli(epsilon-caprolactona) y Eudragit® RS como vehículo para la administración oral de insulina (206). El hecho más interesante ha sido el gran potencial hipoglucemiante de estas nanopartículas. Este efecto comienza a observarse a las 2 horas de su administración y se mantiene durante al menos 24 horas. Estos resultados pueden explicarse por la presencia en Eudragit RS de grupos de metil amonio ionizables, que confieren a las nanopartículas una carga neta positiva favoreciendo el desarrollo de interacciones bioadhesivas con la mucosa. Además, los polímeros bioadhesivos (como Eudragit RS o quitosano) son capaces de abrir de forma reversible las uniones estrechas que existen entre las células constitutivas de las mucosas del organismo, favoreciendo de esta manera el transporte de macromoléculas (215).

También se ha investigado el potencial de las nanopartículas de quitosano para aumentar la biodisponibilidad oral de macromoléculas. Así, Pan y colaboradores (202) estudiaron la capacidad de estos sistemas para promover la absorción de insulina en un modelo de ratas diabéticas inducido por aloxano. En este caso, una dosis de 14 UI/kg administrada por vía oral inducía un efecto hi-

poglucémico significativamente mayor que el obtenido en el grupo control. Cuando las dosis de insulina aumentaban, el efecto hipoglucemiante aparecía de forma más temprana y se prolongaba en el tiempo. En otro estudio, el mismo grupo investigó el efecto del tamaño de las nanopartículas de quitosano conteniendo insulina en el mismo modelo animal (203). Se pudo constatar como el diámetro de las partículas es un parámetro importante que condiciona el efecto de la proteína encapsulada. Así, el mayor efecto hipoglucemiante se observó con nanopartículas de 350 nm. En este caso, los niveles plasmáticos de glucosa eran remarcadamente bajos, con un efecto máximo a las 15 h que era cuantificable durante al menos 35 horas. Además, la disponibilidad farmacológica relativa, frente a una inyección subcutánea de insulina, era del 10% (para nanopartículas de 120 nm), 15% (nanopartículas de 350 nm) y 7% (partículas de 1000 nm).

En otro interesante trabajo, Ma y colaboradores evaluaron el comportamiento de nanopartículas de quitosano preparadas en condiciones de pH diferentes (pH 5,3 y pH 6,1) (201). En condiciones ácidas, las nanopartículas eran ligeramente menores que aquellas preparadas a pH 6,1 (270 vs 340 nm); aunque la cantidad de insulina incorporada en las nanopartículas era dos veces mayor cuando las nanopartículas se obtenían a pH 6,1. En un modelo de rata diabética, se observó una disminución sostenida de los niveles de glucosa en plasma con las nanopartículas preparadas a pH 5,3. En realidad, el máximo efecto farmacológico apareció a las 16 horas tras su administración, manteniéndose durante al menos las 11 horas siguientes. Por otra parte, las nanopartículas preparadas a pH 6,1 dieron lugar a un efecto inicial mucho más rápido (a las 2 horas) pero también menos sostenido.

Otra interesante aproximación para aumentar la biodisponibilidad de insulina mediante nanopartículas bioadhesivas fue desarrollado por Lin y colaboradores (193). En este estudio, nanopartículas compuestas de quitosano despolimerizado y ácido poliglutámico [β-PGA] se ensayaron en animales. Para una dosis oral de 15 UI/kg se pudo observar un importante descenso en los niveles plasmáticos de glucosa, manteniéndose durante al menos 10 horas tras la administración de la dosis de nanopartículas.

Además de todos estos tipos de nanopartículas, algunos trabajos basados en la asociación de diferentes ligandos a las nanotecnología han sido desarrollados en los últimos años. Entre los diferentes ligandos que se han propuesto para aumentar la biodisponibilidad de la insulina, mediante la potenciación de la habilidad de las nanopartículas para desarrollar interacciones bioadhesivas, se encuentran la lectinas o aglutinina de germen de trigo (WGA) (204) y ciertos derivados de vitamina B12 (205). En el primer caso, WGA unido covalente-

mente a nanopartículas lipídicas sólidas permitió disminuir los niveles sanguíneos de glucosa de forma remarcable, multiplicando por 2 el efecto farmacológico frente a las nanopartículas convencionales. Por otra parte, la biodisponibilidad relativa (comparada con una administración subcutánea de insulina) fue del 7% para dicha formulación (204).

En el segundo caso, la unión de un derivado de vitamina B12 a la superficie de nanopartículas de dextrano permitió reducir la glucemia de los animales de forma bifásica. Primeramente, se observó una fase caracterizada por una fuerte reducción de la glucemia de los animales (con un máximo a las 5 h) volviendo a los niveles basales a las 8-10 h tras la administración. Posteriormente, se pudo observar una segunda fase de reducción de los niveles de glucosa en sangre que se mantenía durante 2,5 días. El efecto farmacológico fue 3 veces superior con las nanopartículas funcionalizadas con el derivado de vitamina B12 que con las nanopartículas convencionales (205).

Tratamiento de la osteoporosis

Calcitonina (CT), una hormona polipéptidica endógena compuesta por 32 aminoácidos, juega un papel crucial en la homeostasis del calcio y en el remodelado del hueso. Normalmente, calcitonina es usada para tratar la osteoporosis y la enfermedad de Paget. De acuerdo con los datos de la Fundación Americana de Osteoporosis, esta enfermedad afectaría a aproximadamente 55 millones de ciudadanos de EEUU o al 55% de la población mayor de 50 años (216). En España, según la Sociedad Española de Reumatología, esta enfermedad afectaría a unos 2,5 millones de personas (217).

En principio, cuatro formas diferentes de CT son usadas en clínica: CT humana sintética (hCT), CT sintética de salmón (sCT), CT natural porcina (pCT) y un análogo de CT de anguila (Elcatonina). CT es degradada de forma intensa en el tracto gastrointestinal y su administración por vía oral implica la administración de grandes dosis. Por ello, el empleo de nanotecnologías es una estrategia interesante para favorecer e incrementar la biodisponibilidad oral de este péptido.

La Tabla 10.5 muestra algunos ejemplos relativos al uso de nanopartículas poliméricas para la administración oral de calcitonina. Entre los tipos de nanopartículas utilizadas destacan las basadas en poli(alquilcianoacrilatos), derivados de poli(estireno), poli(ésteres) y quitosano.

Tabla 10.5. *Ejemplos representativos de las nanopartículas empleadas para la administración oral de calcitonina.*

Formulación Referencia	Descripción	Características	Animal	Resultados
NP PLGA 218	PLGA 50:50; MW 8000 Complejo oleato-sCT	170-320 nm 9-27 mg/mg EE: 53-95%	Rata SD hembra Dosis: 60 mg/kg	Biodisponibilidad del 0,4%
NP PS-PNIPAA 219-221	sCT	895 nm EA: 15%	Rata SD macho	Reducción AUC frente a control (NP PNIPAA)
NP PS-PNIPAA-PVA		386 nm EA: 30%		AUC 3 veces menor que para control
NP PS-PNIPAA-PMAA		540 nm EA: 100%		Similar AUC que control
NP PS-PVA-PMAA		318 nm EA: 92%		AUC 1,3 veces menor que control
NP PLGA recubiertas con quitosano 222	PLGA 75:25 MW: 20000 Elcatonina	650 nm 14 mg/mg EE: 62%	Rata Wistar macho Dosis: 500 IU/kg	Máxima reducción de nivel de Ca2+: 25% Respuesta de hipocalcemia prolongada (aprox. 36 h.)
Nanocápsulas quitosano 223	sCT	270 nm EE: 44%	Rata SD macho Dosis: 500 IU/kg	Máxima reducción de nivel de Ca2+: 30% Respuesta de hipocalcemia prolongada (aprox. 24 h.)
Nanopartículas lipídicas recubiertas de quitosano 224	sCT	537 nm EE: 31%	Rata SD macho Dosis: 500 IU/kg	Máxima reducción de nivel de Ca2+: 30% Respuesta de hipocalcemia prolongada (aprox. 24 h.)
Nanocápsulas pegiladas de quitosano 225	sCT	250 nm EE: 44-52%	Rata SD macho Dosis: 500 IU/kg	Máxima reducción de nivel de Ca2+: 30% Respuesta de hipocalcemia prolongada (aprox. 24 h.)

NP: nanopartículas; PLGA: poli(láctico-co-glicólico); PS: poli(estireno); PNIPAA: poly(N-isopropilacrilamida); PMAA: ácido poli(metacrílico); PVA: poli(vinilamina); MW: peso molecular; sCT: calcitonina sintética de salmon; EA: eficacia de asociación (%); EE: eficacia de encapsulación (%); SD: Sprague-Dawley; AUC: area bajo la curva de los niveles de calico en sangre en función del tiempo.

Lowe y Temple (226) describieron la encapsulación de hCT en nanocápsulas de PIBCA. Aunque, el péptido se asociaba de forma eficiente a las nanopartículas, este era liberado muy rápidamente en los medios digestivos y no se pudo observar aumentos importantes en su biodisponibilidad. Mas tarde, calcitonina fue incorporado en el núcleo acuoso de nanocápsulas de poli(isobutilcianoacrilato). Tras su administración a dosis única en ratas, el efecto hipocalcémico observado representaba el 45% del efecto obtenido tras la administración intravenosa de una dosis similar de sCT. La biodisponibilidad oral calculada fue del 40% (227).

En otro interesante trabajo, Sakuma y colaboradores propusieron la utilización de nanopartículas de poli(estireno) recubiertas en superficie con diferentes cadenas poliméricas hidrofílicas (219, 220). Tras optimización, estos autores propusieron nanopartículas recubiertas con poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAA) como vehículos para la administración oral de calcitonina. A pesar de que la sCT fue adsorbida a la superficie de estas nanopartículas, la formulación mostró un elevado efecto hipocalcémico que se correlacionó con su gran potencial para desarrollar interacciones bioadhesivas en el tracto gastrointestinal (219, 220). Mas recientemente, el mismo grupo ha propuesto la introducción de poli(vinilamida) (PVA) y/o ácido poli(metacrílico) en la superficie de estas nanopartículas para compensar la baja incorporación de sCT y aumentar la protección de la calcitonina frente a tripsina. La mejor solución parece ser la combinación de PNIPAA con PVA, puesto que dicha asociación permite obtener nanopartículas con más calcitonina incorporada en las nanopartículas y con un potencial bastante superior para reducir los niveles plasmáticos de calcio (221).

Por otra parte, San Yoo y Park (218) formularon complejos entre oleato sódico y sCT en nanopartículas de PLGA con el fin de incrementar la eficacia de encapsulación en este tipo de nanopartículas. Estas fueron administradas por vía oral en ratas y las concentraciones sanguíneas de calcio fueron cuantificadas en función del tiempo. Dos horas después de la administración de la dosis de nanopartículas los niveles de calcio comenzaron a descender. Sin embargo, únicamente cantidades ínfimas de sCT pudieron ser cuantificadas y la biodisponibilidad oral calculada fue del 0,4%. Este valor es relativamente bajo comparado con otros previamente descritos (desde 0,5% al 3%), tras la administración de sCT en el yeyuno de perros (228) o en la región colónica de ratas (229).

Otra estrategia empleada para aumentar la biodisponibilidad oral de calcitonina es el recubrimiento de nanopartículas con polímeros mucoadhesivos. En este contexto Elcatonina encapsulada en nanopartículas de PLGA fueron recubiertas con un polímero bioadhesivo como quitosano, ácido poliacrílico o algi-

nato sódico. Las nanoparticulas recubiertas con quitosano mostraron la mayor capacidad adhesiva en un modelo ex vivo. Cuando las diferentes formulaciones se administraron por vía oral en ratas, de nuevo las nanopartículas recubiertas con quitosano mostraron el mayor efecto hipocalcémico. El nivel de calcio disminuyó temporalmente hasta el 80-85% durante la primera hora tras la administración. Además, una significante y prolongada reducción de los niveles plasmáticos de calcio fué observada durante las primeras 12 horas tras su administración. A la máxima dosis administrada (500 UI/kg), se observó una reducción muy fuerte y prolongada de aproximadamente 36 horas, de los niveles de calcio. Para las nanopartículas convencionales o no recubiertas, el efecto farmacológico fue significativamente menor (222).

En una estrategia similar, nanopartículas lipídicas y liposomas fueron también recubiertos con quitosano y evaluados como vehículos para la administración oral de calcitonina. Así, en un trabajo reciente, nanopartículas lipídicas recubiertas con quitosano fueron comparadas con nanocápsulas de quitosano conteniendo sCT (223). Ambas formulaciones mostraron una rápida y drástica reducción de los niveles séricos de calcio tras la administración de una dosis única de 500 UI/kg. Además, esta baja calcemia se mantuvo durante al menos 24 h. Estos niveles de reducción son similares a los descritos para otros sistemas similares como liposomas recubiertos con quitosano (230) o nanopartículas recubiertas con poli(N-isopropilacrilamida) (221).

Sin embargo, la habilidad de las nanocápsulas de quitosano para prolongar la respuesta farmacológica es superior a la descrita por otros sistemas y vehículos. Parece ser que la habilidad de estas nanopartículas sería debido a una superior capacidad para desarrollar interacciones bioadhesivas en el tracto gastrointestinal y facilitar el transporte paracelular de macromoléculas (230-232). Más recientemente, nanocápsulas pegiladas de quitosano han mostrado también importantes descensos en la calcemia de animales de laboratorio durante al menos 24 h (225). Sin embargo, esta respuesta sería muy similar a la que se ha observado con nanocápsulas convencionales de quitosano por lo que la pegilación no aportaría, en este caso, ventajas adicionales.

Administración de macromoléculas por las vías nasal y pulmonar

La administración de insulina y calcitonina por las rutas nasal y pulmonar ha sido también objeto de un gran interés. Esto es debido a la elevada permeabilidad y baja actividad enzimática de estas mucosas en comparación con la del tracto

gastrointestinal. Así, nanopartículas de quitosano conteniendo insulina fueron capaces de reducir a la mitad la glucemia de conejos, 30 minutos depués de su administración (233). La amplitud de dicho efecto fue mucho menos pronunciada con una solución de insulina conteniendo quitosano. Recientemente, ha sido demostrado el transporte de nanopartículas pegiladas de PLA a través de la mucosa nasal (234). Los factores que parecen condicionar dicho paso de la mucosa nasal son el tamaño y la densidad del recubrimiento de PEG. Por otra parte, nanocomplejos de insulina obtenidos con un copolímero de PLA y poli(vinilalcohol) también aumentaron la biodisponibilidad de la insulina dando lugar a una reducción de la glucemia tanto en ratas sanas como en ratas diabéticas (235). En general cuanto más hidrofílicos eran los nanocomplejos, más elevada fue la absorción.

La administración intranasal de nanopartículas de insulina parece muy interesante en cuanto da lugar a una rápida absorción, aunque el efecto es poco duradero (1,5-2 horas). Para conseguir una forma más sostenida de liberación de insulina, Tanaka y colaboradores (236) sugirieron la administración del gen de la insulina por vía nasal utilizando liposomas como vehículo. La producción sostenida de insulina se obtuvo en ratones diabéticos siguiendo tratamientos diarios gracias a la transfección de las células epiteliales alveolares de los pulmones. En este estudio, los pulmones parecen el principal tejido en el cual tiene lugar la expresión génica tras la administración nasal de estos liposomas (236). En cualquier caso, el nivel de insulina producida fue suficiente para corregir la hiperglucemia de los ratones diabéticos sin producir hipoglucemia u otro tipo de efectos adversos. En otros trabajos también se ha demostrado la viabilidad de los liposomas para la administración pulmonar de insulina (237) o para promover su absorción (238). De todas formas, aunque el epitelio pulmonar representa un lugar atractivo para la administración de principios activos, ya que su superficie es de aproximadamente 80 m^2, hay que recordar que su función principal no es la absorción. Así, en el momento actual, todos los nanosistemas empleados para aumentar la absorción de fármacos a través de la mucosa pulmonar (y nasal) pueden ser sospechosos de peligroso para la salud (237), cuando además hay poco conocimiento acerca de los hipotéticos efectos tóxicos de un uso prolongado.

APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES Y LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO DE ÓRGANOS

La terapeutica más usual, tanto para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como para la prevención del rechazo de órganos, está basada en la

modulación de la respuesta inmune mediante el uso de fármacos inmunosupresores. El fármaco representativo y más utilizado es la ciclosporina A (CA). Por vía oral, CA es utilizado para prevenir el rechazo, mientras que por vía tópica se utiliza para controlar la progresión de las enfermedades oftálmicas autoinmunes. En general, el fármaco muestra una baja biodisponibilidad debido a su baja permeabilidad y a ser substrato de la P-glicoproteína y de otros complejos enzimáticos.

En administración oral, la mayoría de los intentos realizados utilizando liposomas o nanopartículas poliméricas han dado lugar a valores de biodisponibilidad relativa significativamente menores a los obtenidos con la formulación utilizada en clínica basada en la incorporación del fármaco en una microemulsión (239-241). Tal vez, una de las pocas excepciones hayan sido las nanopartículas de poli(épsilon-caprolactona) desarrolladas por Molpeceres y colaboradores. En este caso, el área bajo la curva de concentración plasmática de CA en función del tiempo fue 2 veces mayor para las nanopartículas que para la microemulsión comercial Sandimmun® Neoral (242, 243). En otro trabajo del mismo grupo, se cuantificó una mayor concentración del fármaco en tejidos y sangre tras la administración del inmunomodulador en nanopartículas de PEC que cuando se administraba bajo forma de la microemulsión comercial. Sin embargo, y a pesar de la mayor concentración sanguínea, la toxicidad renal del fármaco de ambas formulaciones fue similar (244).

Por otra parte, timopentina (TP5) es un pentapéptido (Arg-Lys-Asp-Val-Tyr) que constituye el segmento 32-36 de la timopoietina (245). Como agente inmunomodulador, TP5 se utiliza en los tratamientos como la dermatitis atópica, el síndrome de Sezary, la artritis reumatoide así como para disminuir la inmunocompetencia en ciertos pacientes (246, 247). Debido a su baja permeabilidad a través de membranas, metabolismo en el tracto gastrointestinal y extremadamente baja vida media en el organismo (inferior a 30 segundos), la administración de TP5 requiere inyecciones repetidas frecuentemente o perfusión intravenosa, lo cual restringe mucho sus posibles aplicaciones clínicas (248).

Timopentina se incorporó en nanopartículas de PLGA y en nanopartículas de PLGA funcionalizadas con WGA (249). En un modelo de ratas inmunosuprimidas con ciclofosfamida, se administró por vía oral dichas nanopartículas y se retiraron muestras de sangre para analizar las poblaciones de linfocitos por citometría de flujo. Para las nanopartículas recubiertas con la lectinas, los valores de cociente entre $CD4^+$ y $CD8^+$ fueron significativamente mayores que para las nanopartículas convencionales (249). Este efecto se correlacionó con el hecho de que la unión de WGA a la superficie de las nanopartículas de PLGA au-

mentaba de forma significativa la absorción oral de TP5 debido a un fenómeno de bioadhesión específico en la membrana intestinal.

En otro interesante trabajo, nanopartículas de quitosano trimetilado conteniendo TP5 se administraron en animales de laboratorio. En este caso, el cociente entre $CD4^+$ y $CD8^+$ fue 2,6 veces mayor que el obtenido para el grupo control (250). Resultados similares fueron obtenidos por Zheng y colaboradores (251) utilizando nanopartículas de quitosano recubiertas con Eudragit S con el fin de protegerlas del pH estomacal (251).

Por lo que respecta al tratamiento de las enfermedades autoinmunes oftálmicas, existe un real interés en la administración de ciclosporina A mediante el uso de liposomas y/o nanopartículas. Los sistemas nanoparticulados actúan como reservorios del fármaco, permitiendo la liberación sostenida de CA, incrementando el tiempo de residencia en contacto con la superficie del ojo y, en algunos casos, promoviendo su penetración intraocular (252-255).

Por una parte, los liposomas han mostrado una elevada capacidad para aumentar la biodisponibilidad intraocular de ciclosporina A sin inducir toxicidad en la retina (256). Por otra parte, utilizando nanopartículas de quitosano se pudo determinar que la concentración terapeutica de ciclosporina A se mantenía durante, al menos, 48 horas en la superficie ocular, principalmente en la córnea y en la conjuntiva. Además no se pudieron cuantificar niveles de fármaco en las estructuras internas oculares (iris, cuerpo ciliar y humor acuoso) ni en sangre (257). En cualquier caso, de entre los distintos sistemas propuestos y evaluados, aquellos basados en el uso de quitosano han presentado el mayor potencial para la administración de ciclosporina A en el tejido periocular (240, 258).

Para el tratamiento de la uveitis ocular, el uso de tamoxifeno asociado a nanopartículas pegiladas de poli(alquilcianoacrilatos) [copolímero de polietilenglicol-cianoacrilato y hexadecilcianoacrilato] mostró una dramática reducción del proceso inflamatorio. Administradas por la vía intraocular, la concentración de tamoxifeno pudo ser mantenida de forma sostenida durante un largo periodo de tiempo (259).

Otros compuestos como los glucocorticoides también han sido asociados a las nanopartículas para controlar las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, liposomas pegilados han sido utilizados para administrar elevadas concentraciones de metilprednisolona al cerebro para el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos, que. parecen ser debidos a la aparición de enfermedades autoinmunes (260).

Merodio y colaboradores estudiaron la distribución de nanopartículas de albúmina en un modelo de enfermedad autoinmune en el sistema nervios central

con el fin de evaluar el potencial de estos vehículos para atravesar la barrera hematoencefálica (261). La barrera hematoencefálica es una membrana formada por células endoteliales, células de la glía (astrocitos y pericitos) y la membrana basal (262), caracterizada por la ausencia de pequeños poros o fenestraciones en los capilares que alcanzan el sistema nervioso central (263). El resultado es un obstáculo formidable y complejo para numerosos fármacos. Ciertas enfermedades neurológicas están caracterizadas por alteraciones significativas en esta barrera como pueden ser la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, ciertos tumores o, incluso, infecciones por citomegalovirus o VIH (264). En el caso de la esclerosis múltiple, está enfermedad está siendo ampliamente estudiada en el modelo ratón de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) (265). En el caso de las nanopartículas de albúmina se pudo observar que cuando se administraban por vía parenteral, estas se localizaban en las áreas afectadas por este transtorno en el sistema nervioso central, principalmente la porción lumbar de la médula espinal, el quiasma óptico y los lóbulos del cerebelo (261). Por otra parte, estudios inmunocitoquímicos revelaron que los macrófago circulantes, que migran a las áreas dañadas del sistema nervioso central, y células de microglía residentes eran las responsables de la distribución de las nanopartículas de albúmina en el modelo de EAE. De la misma manera, nanopartículas pegiladas de poli(alquilcianoacrolato) también fueron capaces de alcanzar el tejido cerebral de ratas con encefalomielitis autoinmune experimental y mostraron una distribución similar a la observada con las nanopartículas de albúmina (266).

APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN EL TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN

Uno de los principales inconvenientes de los fármacos antiinflamatorios, por ejemplo, diclofenaco o indometacina, es su toxicidad local en contacto con los tejidos. Estos fármacos inducen úlceras en la mucosa gastrointestinal cuando son administrados por vía oral y pueden inducir daño en el epitelio córneo tras su instilación o en el tejido muscular tras su inyección. La toxicidad local puede reducirse de forma considerable mediante encapsulación de estos fármacos en nanocápsulas o liposomas, manteniendo intacta la actividad del fármaco (267-270).

Tras administración oral, las formulaciones de nanocápsulas exhiben perfiles farmacocinéticos similares a aquellos obtenidos con el fármaco libre, minimizando los efectos tóxicos. Este efecto puede ser explicado por la mejor repartición de las nanopartículas a lo largo del tracto gastrointestinal, con lo que

las concentraciones locales serían mucho más bajas y se reducirían los efectos ulcerativos (271).

Tras inyección intramuscular, la protección frente a la toxicidad del fármaco parece ser dependiente de la naturaleza del aceite encapsulado en el núcleo de la nanocápsula. Así nanocapsulas conteniendo diclofenaco incorporado en bencilbenzoato fueron tan tóxicas como el principio activo libre. Por el contrario, diclofenaco incorporado en nanocapsulas conteniendo Miglyol fueron capaces de reducir considerablemente el daño muscular causado por diclofenaco (272).

En el caso de tratamientos oculares, un importante incremento en la biodisponibilidad de la indometacina fue descrito al incorporar este fármaco en nanocápsulas de poli(épsilon-caprolactona) (273). Mediante microscopía confocal, se pudo demostrar que la formulación de nanocáspulas aumentaba la penetración del principio activo en el epitelio de la córnea por un mecanismo de endocitosis. Un trabajo similar utilizando ibuprofeno encapsulado en nanopartículas de Eudragit también demostró de forma concluyente que estos nanosistemas aumentaban la biodisponibilidad del antiinflamatorio y la eficacia de su actividad farmacológica [274]. Resultados similares se han obtenido recientemente con indometacina encapsulada en nanopartículas de quitosano (275).

Por otra parte, los tratamientos con antiinflamatorios también se ven dificultados por la pobre solubilidad de muchos fármacos, como ibuprofeno o naproxeno. La utilización de la nanotecnología permite aumentar de forma exponencial la superficie de intercambio entre la molécula activa y el medio biológico que la rodea. Esto favorece la disolución del fármaco, así como mejorar su llegada a diferentes lugares del organismo (276-278).

APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA AL TRATAMIENTO DEL DOLOR

Recientemente, los liposomas han atraído la atención acerca de su potencial para el tratamiento y control del dolor, principalmente como vehículos capaces de sostener la liberación de compuestos anestésicos. Estos vehículos pueden ser utilizados por vía tópica (279, 280) o por inyección directa en el momento de la intervención quirúrgica (281, 282). Para anestesia local, la formulación de liposomas conteniendo anestésicos (lidocaína, tetracaina, etc…) se incorporó en una crema que fue aplicada sobre la superficie de la piel (283). La eficacia de este sistema fue evaluado en ensayos clínicos, concluyendo que los liposomas (tanto conteniendo tetracaina como lidocaína) fueron al menos tan

eficaces como las mezclas eutécticas de dichos anestésicos locales. Estas formulaciones permitían una administración eficaz y mostraban un inicio de la acción comparable a otras formulaciones en uso. Hoy en día, esta rutina parece ser de menor coste que las mezclas eutécticas de los anestésicos locales. Por otra parte, de acuerdo con otros ensayos clínicos más recientes, se ha sugerido que la formulación liposomal de lidocaína debería ser el nuevo tratamiento estándar para anestesia cutánea en niños (280).

Los liposomas también forman parte de las técnicas emergentes para analgesia post-operatoria en cirugía ortopédica (281, 282). Se han propuesto para la administración de morfina como una alternativa a los otros tratamientos convencional del dolor con este fármaco (281, 284). La formulación liposomal de morfina propuesta para el control post-operatorio del dolor es una formulación de liberación extendida de administración epidural. La tecnología de los liposomas consiste en partículas lipídicas con cámaras internas estrechamente empaquetadas y separadas por una membrana lipídica (Depodur®, Skye Pharma Inc, Endo Pharmaceuticals USA). El resultado del ensayo clínico Fase III concluyó que cuando estos liposomas eran administrados en el espacio epidural, se obtenía hasta 48 h de alivio del dolor (282, 285).

Además de los liposomas, un estudio reciente ha demostrado la eficiacia de las nanocápsulas lipídicas sólidas con ibuprofeno para el tratamiento y control del dolor (286). Administradas a animales de laboratorio por la vía oral o por la ruta intravenosa, estas nanocápsulas inducían un alivio del dolor durante un periodo prolongado. Una ventaja de esta formulación es que ofrece un vehículo inyectable de ibuprofeno, lo cual es una alternativa interesante a las formulaciones convencionales con elevadas cantidades de tensioactivos o co-solventes.

En la misma línea, Betbeder y colaboradores (287) mostraron que puede ser posible administrar morfina al cerebro mediante la administración intranasal de SupraMolecular BioVector®, gracias a la posible existencia de un camino directo entre la mucosa olfativa y el sistema nervioso central (288). De forma adicional, aunque los nanosistemas pueden ser optimizados en cuanto a su tamaño y potencial bioadhesivo para la administración intranasal de fármacos (223), el diseño de tecnología para poder administrar fármacos y atravesar la barrera hematoencefálica está menos avanzado (289, 290). Hasta el momento se han sugerido dos posibles tipos de nanosistemas: aquellos basados en el transporte mediado por receptor y los sistemas basados en el recubrimiento con tensioactivos. En el primer caso, se han propuesto la utilización del receptor de transferrina (291, 292) o el de insulina (290) para poder incrementar la eficacia de liberación de fármacos en el cerebro. En el segundo caso, se ha postulado que nano-

partículas recubiertas con diferentes tensioactivos (poloxamer o polisorbatos) serían endocitadas por el receptor de lipoproteínas de baja densidad de las células endoteliales de los capilares de la barrera hematoencefálica (293, 294).

CONCLUSIONES

La introducción de la nanotecnología en la farmacología ha revolucionado la administración de fármacos, permitiendo la aparición de nuevos tratamientos con mayor especificidad. En principio, la nanotecnología ha permitido aumentar el rendimiento biológico y farmacológico de diferentes principios activos y ofrecer alternativas interesantes para formular las nuevas moléculas originarias de la biotecnología. Todo ello ha permitido que, a nivel experimental, hayan sido desarrollado sistemas originales que prolonguen y mantengan la concentración del antiinfeccioso en el lugar exacto donde se localiza el microorganismo en el interior de las células del huésped. Igualmente, la nanotecnología ha permitido que se proponga la utilización de nueva vías de administración, impensables con las formas farmacéuticas convencionales, para macromoléculas terapéuticas como los péptidos y proteínas de uso en enfermedades metabólicas. Por último, la nanotecnología ofrece una herramienta poderosa para el desarrollo de nuevos sistemas galénicos terapéuticos destinados al tratamiento de las enfermedades autoinmunes, la inflamación y el dolor.

Sin embargo, hasta el presente, no se ha conseguido todavía de forma notable una trasposición fluida y adecuada de los desarrollos y trabajos realizados en el plano experimental preclínico hacia la clínica. Es cierto que, en muchos aspectos, queda todavía una cantidad importante de trabajo experimental a realizar para acabar de comprender y elucidar el comportamiento de las nanopartículas en el organismo, así como, de las implicaciones toxicológicas de una administración crónica de tratamientos basados en estos vehículos.

Por todo ello, y teniendo en cuenta que la nanotecnología no es la panacea que permitirá resolver todos los problemas ligados a la administración de fármacos, esta nueva estrategia parece muy prometedora para mejorar a corto y medio plazo la terapéutica de algunas de los temas tratados en este capítulo.

Abreviaturas:

CA: ciclosporina A; **CMVH:** citomegalovirus humano; **sCT:** calcitonina sintética de salmón; **EA:** eficacia de asociación (%); **EAE:** encefalomielitis autoinmune experi-

mental; **EE:** eficacia de encapsulación (%); **EF:** eficacia farmacológica; **FR:** biodisponibilidad relativa; **FAO:** oligómero de anhídrido fumárico; **Fe:** tetraóxido de hierro; **GEN:** gentamicina; **HP55:** phtalato de celulosa; **HPCD:** hidroxipropil-beta-ciclodextrina; **MAC:** complejo *Mycobacterium avium - Micobacterium intrcellulare*; **MW:** peso molecular; **NP:** nanopartículas; **OPM:** O-palmitoil-manano; **PAM:** p-aminofenil-manopiranósido; **PEC:** poli(épsilon-caprolactona); **PEG:** polietilenglicol; **PGA:** ácido poli(glutámico); **PIBCA:** poli(isobutil-2-cianoacrilato); **PLGA:** poli(láctico-co-glicólico); **PMAA:** ácido poli(metacrílico); **PNIPAA:** poly(N-isopropilacrilamida); **PS:** poli(estireno); **PVA:** poli(vinilamina); **SBECD:** sulfobutiléter-beta-ciclodextrina; **SD:** ratas Sprague-Dawley; **STZ:** estreptozotocina; **TAT:** péptido activador (NH2-YGRKKRRQRRR); **TP5:** timopentina; **UFC:** unidad formadora de colonias; **VIH:** virus de inmunodeficiencia humana; **WGA:** lectina de germen de trigo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Heym, B. & Cole, S.T. (1997) Multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 8: 61-70.

(2) Lboutounne, H., Chaulet, J.F., Ploton, C., Falson, F. & Pirot, F. (2002) Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(e-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J. Control. Release*. 82: 319-334.

(3) Beyth N., Yudovin-Farber, I., Bahir, R., Domb, A.J. & Weiss, E.I. (2006) Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against Streptococcus mutans. *Biomaterials*. 27: 3995-4002.

(4) Turos, E., Reddy, G.S., Greenhalgh, K., Ramaraju, P., Abeylath, S.C., Jang, S., Dickey, S. & Lim, D.V. (2007) Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: restoring the activity of beta-lactam antibiotics against MRSA. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 17: 3468-3472.

(5) Beyth, N., Houri-Haddad, Y., Baraness-Hadar, L., Yudovin-Farber, I., Domb, A.J. & Weiss, E.I. (2008) Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethylenimine nanoparticles. *Biomaterials*. 29: 4157-4163.

(6) van den Broek, P.J. (1989) Antimicrobial drugs, microorganisms and phagocytes. *Rev. Infect. Dis*. 11: 213-245.

(7) Tulkens, P.M. (1991) Intracellular distribution and activity of antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 10: 100-106.

(8) Kaprelyants, A.S., Gottschal, J.C. & Kell, D.B. (1993) Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*. 104: 271-286.

(9) Gilbert, P., Collier, P.J. & Brown, M.R.W. (1990) Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother*. 34: 1865-1868.

(10) Poste, G. (1983) Liposomes targeting in vivo: problems and opportunities. *Biol. Cell*. 47: 19-39.

(11) Grislain, L., Couvreur, P., Lenaerts, V., Roland, M., Deprez-Decampeneere, A. & Speiser, P. (1983) Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier. *Int. J. Pharm*. 15: 335-345.

(12) Pinto-Alphandary, H., Andremnot, A. & Couvreur, P. (2000) Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 13: 155-168.

(13) Couvreur, P. & Vauthier, C. (2006) Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharm. Res*. 23: 1417-1450.

(14) Dupont, B. (2002) Overview of the lipid formulations of amphothericin B. *J. Antimicrob. Chemother*. 49: 31-36.

(15) Ringden, O. (2002) Ten years' experience with liposomal amphotericin B in transplant recipients at Huddinge University Hospital. J. *Antimicrob. Chemother.* 49: 51-55.

(16) Croft, S.L. & Coombs, G.H. (2003) Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 19: 502-508.

(17) Ng, A.W.K. & Wasan, K.M. (2003) Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective. *J. Pharm. Sci*. 6: 67-83.

(18) Gibbs, W.J., Drew, R.H. & Perfect, J.R. (2005) Liposomal amphotericin B: clinical experience and perspectives. *Expert Rev. Anti-infect. Ther*. 3: 167-181.

(19) Owais, M., Varshney, G.C., Choudhury, A., Chandra, S. & Gupta, C.M. (1995) Chloroquine encapsulated in malaria-infected erythrocyte-specific antibody-bearing liposomes effectively controls chloroquine-resistant Plasmodium berghei infections in mice. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 39: 180-184.

(20) Graybill, J.R., Craven, P.C., Taylor, R.L., Williams, D.M. & Magee, W.E. (1982) Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associated amphotericin B. *J. Infect. Dis*. 145: 748-752.

(21) Taylor, R.L., Williams, D.M., Craven, P.C., Graybill, J.R., Drutz, D.J. & Magee, W.E. (1982) Amphotericin B in liposomes: a novel therapy for histoplasmosis. *Am. Rev. Respir. Dis*. 125: 610-611.

(22) Adler-Moore, J. & Proffitt, R.T. (2002) AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J. Antimicrob. Chemother.* 49: 21-30.

(23) Chakraborty, K.K. & Naik S.R. (2003) Therapeutic and hemolytic evaluation of in-situ liposomal preparation containing amphotericin-beta complexed with different chemically modified beta-ciclodextrins. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6: 231-237.

(24) van Etten, E.W., van Vianen, W., Hak, J. & Bakker-Woudenberg, I.A. (1988) Activity of liposomal amphotericin B with prolonged circulation in blood versus those of AmBisome and fungizone against intracellular Candida albicans in murine peritoneal macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42: 2437-2439.

(25) Vyas, S.P., Katare, Y.K., Mishra, V. & Sihorkar, V. (2000). Ligand directed macrophage targeting of amphotericin B loaded liposomes. *Int. J. Pharm*. 210: 1-14.

(26) Espuelas, M.S., Legrand, P., Campanero, M.A., Appel, M., ChéÈron, M., Gamazo, C., Barratt, G. & Irache, J.M. (2003) Polymeric carriers for amphotericin B: in vitro activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic Candidiasis in neutropenic mice. *J. Antimicrob. Chemother*. 52: 419-427.

(27) Fukui, H., Koike, T., Nakagawa, T., Saheki, A., Sonoke, S., Tomii, Y. & Seki, J. (2003) Comparison of LNS–AmB, a novel low-dose formulation of amphotericin B with lipid nano-sphere (LNS), with commercial lipid-based formulations. *Int. J. Pharm*. 267: 101-112.

(28) Johnson, E.M., Ojwang, J.O., Szekely, A., Wallace, T.L. & Warnock, D.W. (1988) Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. Antimicrob. *Agents Chemother*. 42: 1412-1416.

(29) Oakley, K.L., Moore, C.B. & Denning, D.W. (1999) Comparison of in vitro activity of liposomal nystatin against Aspergillus species with those of nystatin, amphotericin B (AB) deoxycholate, AB colloidal dispersion, liposomal AB, AB lipid complex, and itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1264-1266.

(30) Wallace, T.L., Paetznick, V., Cossum, P.A., Lopez-Berestein, G., Rex, J.H. & Anaissie, E. (1997) Activity of liposomal nystatin against disseminated Aspergillus fumigatus infection in neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother*. 41: 2238-2243.

(31) Nasti, T.H., Khan, M.A. & Owais, M. (2006) Enhanced efficacy of pH-sensitive nystatin liposomes against Cryptococcus neoformans in murine model. *J. Antimicrob. Chemother*. 57: 349-352.

(32) Adler-Moore, J.P. & Proffitt, R.T. (1993) Development, characterization, efficacy and mode of action of Ambisome, a unilamellar liposome formulation of amphotericin B. *J. Liposome Res*. 3: 429-450.

(33) Walsh, T.J., Goodman, J.L., Pappas, P., Bekersky, I., Buell, D.N., Roden, M., Barrett, J. & Anaissie, E.J. (2001) Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with Aspergillus species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 3487-3496.

(34) Murray, H.W. (2004) Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* 2: 279-292.

(35) Murray, H.W. (2004) Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71: 787-794.

(36) Wingard, J.R., White, M.R., Anaissie, E., Raffalli, J., Goodman, J. & Arrieta, A. (2000) A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. *Clin. Infect. Dis.* 31: 1155-1163.

(37) Fortú˙n, J., Martín-Dávila, P., Moreno, S., Barcena, R., de Vicente, E. & Honrubia, A. (2003) Prevention of invasive fangal infections in liver transplant recipients: The role of prophylaxis with lipids formulations of amphotericin B in high risks patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 813-819.

(38) Monforte, V., Gavaldá, J., Román, A., López, R., Bravo, C., Pou, l., Len, O., Morell, F. & Pahissa, A. (2004) Pharmacokinetics and efficacy of nebulized AmBisome®Æ (N-LAB) in lung transplantation (LT) ICAAC 2004.

(39) Cagnoni, P.J., Walsh, T.J., Prendergast, M.M., Bodensteiner, D., Hiemenz, S., Greenberg, R.N., Arndt, C., Schuster, M., Seibel, N., Yeldandi, V. & Tong, K.B. (2000) Pharmacoeconomic analysis of liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistent febrile neutropenic patients. *J. Clin. Oncol.* 18: 2476-2483.

(40) Larabi, M., Yardley, V., Loiseau, P.M., Appel, M., Legrand, P., Gulik, A., Boris, C., Croft, S. & Barratt, G. (2003) Toxicity and antileishmanial activity of a new stable lipid suspension of amphothericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3774-3779.

(41) Espuelas, M.S., Legrand, P., Cheron, M., Barratt, G., Puisieux, F., Devissaguet, J.Ph. & Irache, J.M. (1988) Interaction of amphotericin B with polymeric colloids: 1. A spectroscopy study. *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* 11: 141-151.

(42) Espuelas, M.S., Legrand, P., Cheron, M., Barratt, G., Puisieux, F., Renedo, M.J., Devissaguet, J.Ph. & Irache, J.M. (1988). Interaction of amphotericin B with polymeric colloids: 2. Effect of poloxamer on the adsorption of amphotericin B onto poly(e-caprolactone) nanospheres. *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* 11: 203-212.

(43) Espuelas, S., Legrand, P., Loiseau, P.M., Bories, C., Barratt, G. & Irache, J.M. (2002) In vitro antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(e-caprolactone) nanospheres. *J. Drug Target.* 10: 593-599.

(44) Espuelas, S., Legrand, P., Loiseau, P.M., Bories, C., Barratt, G. & Irache, J.M. (2000) In vitro reversion of amphotericin B resistance in Leishmania donovani by poloxamer 188. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2190-2192.

(45) Gaspar, R., Preat, V., Opperdoes, F.R. & Rolland, M. (1992) Macrophage activation by polymeric nanoparticles of polyalkylcyanoacrylates: activity against intracellular Leishmania donovani associated with hydrogen peroxide production. *Pharm. Res*. 9: 782-787.

(46) Mullen, A.B., Baillie, A.J. & Carter, K.C. (1998) Visceral leishmaniasis in the BALB/c mouse: a comparison of the efficacy of a nonionic surfactant formulation of sodium stibogluconate with those of three proprietary formulations of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42: 2722-2725.

(47) Carter, K.C., Mullen, A.B., Sundar, S. & Kenney, R.T. (2001) Efficacies of vesicular and free sodium stibogluconate formulations against clinical isolates of Leishmania donovani. *Antimicrob. Agents Chemother*. 45: 3555-3559.

(48) Medda, S., Mukhopadhyay, S. & Basu, M.K. (1999) Evaluation of the in-vivo activity and toxicity of amarogentin, an antileishmanial agent, in both liposomal and niosomal forms. *J. Antimicrob. Chemother*. 44: 791-794.

(49) Sinha, J., Mukhopadhyay, S., Das, N. & Basu, M.K. (2000) Targeting of liposomal andrographolide to L. donovani-infected macrophages in vivo. *Drug Deliv*. 7: 209-213.

(50) Fouarge, M., Dewulf, M., Couvreur, P., Rolland,, M. & Vranckx, H. (1989) Development of dehydroemetine nanoparticles for the treatment of visceral leishmaniasis. *J. Microencapsul*. 6: 29-34.

(51) Tyagi, R., Lala, S., Verma, A.K., Nandy, A.K., Mahato, S.B., Maitra, A. & Basu, M.K. (2005) Targeted delivery of arjunglucoside I using surface hydrophilic and hydrophobic nanocarriers to combat experimental leishmaniasis. *J. Drug Target*. 13: 161-171.

(52) Mosqueira, V.C.F., Loiseau, P.M., Bories, C., Legrand, P., Devissaguet, J.P. & Barratt, G. (2004) Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in Plasmodium berghei-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother*. 48: 1222-1228.

(53) Bakker-Woudenberg, I.A. (2002) Long-circulating sterically stabilized liposomes as carriers of agents for treatment of infection or for imaging infectious foci. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 19: 299-311.

(54) Banerjee, G., Nandi, G., Mahato, S.B., Pakrashi, A. & Basu, M.K. (1996) Drug delivery system: targeting of pentamidines to specific sites using sugar grafted liposomes. *J. Antimicrob. Chemother*. 38: 145-150.

(55) Agrawal, A.K. & Gupta, C.M. (2000) Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 41: 135-146.

(56) Gupta, C.M. & Haq, W. (2005) Tuftsin-bearing liposomes as antibiotic carriers in treatment of macrophage infections. *Methods Enzymol*. 391: 291-304.

(57) Agrawal, A.K., Agrawal, A., Pal, A., Guru, P.Y. & Gupta, C.M. (2002) Superior chemotherapeutic efficacy of amphotericin B in tuftsin-bearing liposomes against Leishmania donovani infection in hamsters. *J. Drug Target*. 10: 41-45.

(58) Alborzi, A., Pourabbas, B., Shahian, F., Mardaneh, J., Pouladfar, G.R. & Ziyaeyan, M. (2008). Detection of Leishmania infantum kinetoplast DNA in the whole blood of asymptomatic individuals by PCR-ELISA and comparison with other infection markers in endemic areas, southern Iran. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 79: 839-842.

(59) Paul, M., Durand, R., Fessi, H., Rivollet, D., Houin, R., Astier, A. & Deniau, M. (1997). Activity of a new liposomal formulation of amphotericin B against two strains of Leishmania infantum in a murine model. *Antimicrob. Agents Chemother*. 41: 1731-1734.

(60) GóÛmez-Flores, R., Hsia, R., Tamez-Guerra, R. & Mehta, R.T. (1996) Enhanced intramacrophage activity of resorcinomycin A against Mycobacterium avium–Mycobacterium intracellulare complex after liposome encapsulation. Antimicrob. *Agents Chemother*. 40: 2545-2549.

(61) Mehta, R.T., Keyhani, A., McQueen, T.J., Rosenbaum, B., Rolston, K.V. & Tarrand, J.J. (1993) In vitro activities of free and liposomal drugs against Mycobacterium avium–M. intracellulare complex and M. tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 37: 2584-2587.

(62) Karlowsky, J.A. & Zhanel, G.G. (1992) Concepts on the use of liposomal antimicrobial agents: applications for aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis*. 15: 654-667.

(63) Donald, P.R., Sirgel, F.A., Venter, A., Smit, E., Parkin, D.P., van de Wal, B.W. & Mitchison, D.A. (2001) The early bactericidal activity of a low-clearance liposomal amikacin in pulmonary tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother*. 48: 877-880.

(64) Fielding, R.M., Lewis, R.O. & Moon-McDermott, L. (1998) Altered tissue distribution and elimination of amikacin encapsulated in unilamellar, low clearance liposomes (Mikasome). *Pharm. Res*. 15: 1775-1781.

(65) Fielding, R.M., Moon-McDermott, L., Lewis, R.O. & Horner, MJ. (1999) Pharmacokinetics and urinary excretion of amikacin in low-clearance unilamellar liposomes after a single or repeated intravenous administration in the rhesus monkey. *Antimicrob. Agents Chemother*. 43: 503-509.

(66) Cynamon, M.H., Swenson, C.E., Palmer, G.S. & Ginsberg, R.S. (1989) Liposome- encapsulated amikacin therapy of Mycobacterium avium complex in beige mice. *Antimicrob. Agents Chemother*. 33: 1179-1183.

(67) Duzgunes, N., Perumal, V.K., Kesavalu, L., Goldstein, J.A., Debs, R.J. & Gangadharam, P.R.J. (1988) Enhanced effect of liposome encapsulated amikacin on Mycobacterium avium–Mycobacterium intracellulare complex infection in beige mice. *Antimicrob. Agents Chemother*. 32: 1404-1411.

(68) Bermudez, L.E.M., Yau-Young, A.O., Lin, J.P., Cogger, J. & Young, L.S. (1990) Treatment of disseminated Mycobacterium avium complex infection of beige mice with liposome-encapsulated aminoglycosides. *J. Infect. Dis.* 161: 1262-1268.

(69) Vladimirsky, M.A. & Ladigina, G.A. (1982) Antibacterial activity of liposome-entrapped streptomycin in mice infected with Mycobacterium tuberculosis. *Biomedicine*. 36: 375-377.

(70) Duzgunes, N., Ashtekar, D.R., Flasher, D.L., Gori, N., Debs, R.J., Friend, D.S. & Gangadharam, P.R.J. (1991) Treatment of Mycobacterium avium–M. intracellulare complex infection in beige mice with free and liposome-encapsulated streptomycin: role of liposome type and duration of treatment. *J. Infect. Dis.* 164: 143-151

(71) Tomioka, H., Saito, H., Sato, K. & Yoneyama, T. (1991) Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated kanamycin against Mycobacterium intracellulare infection induced in mice. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144: 575-579.

(72) Gangadharam, P.R.J., Ashtekar, D.A., Ghori, N., Goldstein, J.A., Debs, R.J. & Duzgunes, N. (1991) Chemotherapeutic potential of free and liposome-encapsulated streptomycin against experimental Mycobacterium avium complex infections in beige mice. *J. Antimicrob. Chemother*. 28: 425-429.

(73) Swenson, C.E., Popescu, M.C. & Ginsberg, R.S. (1988) Preparation and use of liposomes in the treatment of microbial infections. *Crit. Rev. Microbiol.* 15: S1-S31.

(74) Onyeji, C.O., Nightingale, C.H., Nicolau, D.P. & Quintiliani, R. (1994) Efficacies of liposome-encapsulated clarithromycin and ofloxacin against Mycobacterium avium–M. intracellulare complex in human macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother*. 38: 523-527.

(75) Duzgunes, N., Flasher, D., Reddy, M.V., Luna-Herrera, J. & Gangadharam, P.R. (1996) Treatment of intracellular Mycobacterium avium complex infection by free and liposome-encapsulated sparfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 40: 2618-2621.

(76) Deol, P., Khuller, G.K. & Joshi, K. (1997) Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against Mycobacterium tuberculosis infection induced in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1211-1214.

(77) Yanagihara, K. (2002) Design of anti-bacterial drug and anti-mycobacterial drug for drug delivery system. *Curr. Pharm. Des.* 8: 475-482.

(78) Domurado, D., Balazuc, A.M., Lagranderie, M., Pescher, P., Chavarot, P., Roseeuw, E., Coessens, V., Stern, S., Schacht, E. & Marchal, G. (2005) Targeted norfloxacin is active in vivo against persistent Mycobacterium bovis BCG. *J. Control. Release*. 10: 343-345.

(79) Zhang, Y. (2005) The magic bullets and tuberculosis targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 529-564.

(80) Vyas, S.P., Kannan, M.E., Jain, S., Mishra, V. & Singh, P. (2004) Design of liposomal aerosols for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages. *Int. J. Pharm.* 269: 37-49.

(81) Pandey, R. & Khuller, G.K. (2005) Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. *J. Antimicrob. Chemother.* 55: 430-435.

(82) Lahnstein, K., Schmehl, T., Rü¸sch, U., Rieger, M., Seeger, W. & Gessler, T. (2008) Pulmonary absorption of aerosolized fluorescent markers in the isolated rabbit lung. *Int. J. Pharm.* 351: 158-164.

(83) Fattal, E., Rojas, J., Youssef, M., Couvreur, P. & Andremont, A. (1991) Liposome-entrapped ampicillin in the treatment of experimental murine listeriosis and salmonellosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 770-772.

(84) Fattal, E., Youssef, M., Couvreur, P. & Andremont, A. (1989) Treatment of experimental salmonellosis in mice with ampicillin-bound nanoparticles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1540-1543.

(85) Fattal, E., Balland, O., Alphandary, H., Pecquet, S., Puisieux, F., Couvreur, P. & Andremont, A. (1993) Colloidal carriers of antibiotics as an alternative approach for the treatment of intracellular infections. In D. Raoult (ed.), Antimicrobial Agents and Intracellular Pathogens, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 63-72.

(86) Legrand, P., Barratt, G., Mosqueira, V., Fessi, H. & Devissaguet, J.P. (1999) Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. *Sci. Tech. Pharm.* 9: 411-418.

(87) Tadakuma, T., Ikewaki, N., Yasuda, T., Tsutsumi, M., Saito, S. & Saito, K. (1985) Treatment of experimental salmonellosis in mice with streptomycin entrapped in liposomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 28-32.

(88) Fierer, J., Hatlen, L., Lin, J.P., Estrella, D., Mihalko, P. & Yau-Young, A. (1990) Successful treatment using gentamicin liposomes of Salmonella dublin infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 343-348.

(89) Swenson, C.E., Stewart, K.A., Hammett, J.L., Fitzsimmons, W.E. & Ginsberg, R.S. (1990) Pharmacokinetics and in vivo activity of liposome-encapsulated gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 235-240.

(90) Magallanes, M., Dijkstra, J. & Fierer, J. (1993) Liposome-incorporated ciprofloxacin in treatment of murine salmonellosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2293-2297.

(91) Webb, M.S., Boman, N.L., Wiseman, D.J., Saxon, D., Sutton, K., Wong, K.F., Logan, P. & Hope, M.J. (1998) Antibacterial efficacy against an in vivo Salmonella typhimurium infection model and pharmacokinetics of a liposomal ciprofloxacin formulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 45-52.

(92) Bakker-Woundenberg, I.A., Lokerse, A.F., van Den Berg, J.C., Roedink, F.H. & Michel, M.F. (1985) Free versus liposome-entrapped ampicillin in treatment of Listeria monocytogenes in normal and athymic (nude) mice. *J. Inf. Dis.* 151: 917-924.

(93) Bakker-Woudenberg, I.A., Lokerse, A.F. & Roerdink, F.H. (1998) Effect of lipid composition on activity of liposome-entrapped ampicillin against intracellular Listeria monocytogenes. *Antimicrob. Agents Chemother*. 32: 1560-1564.

(94) Yousseff, M., Fattal, E., Alonso, M.J., Roblot-Treupel, L., Sauzieres, J., Tancrede, C., Omnes, A., Couvreur, P. & Andremont, A. (1998) Effectiveness of nanoparticle-bound ampicillin in the treatment of Listeria monocytogenes infection in athymic nude mice. *Antimicrob. Agents Chemother*. 32: 1204-1207.

(95) Page-Clisson, M.E., Pinto-Alphandary, H., Chachaty, E., Couvreur, P. & Andremont, A. (1998) Drug targeting by polyalkylcyanoacrylate is not efficient against persistent Salmonella. *Pharm. Res*. 15: 542-547.

(96) Fountain, M.W., Weiss, S.K., Fountain, A.G., Shen, A. & Lenk, R.P. (1985) Treatment of Brucella canis and Brucella abortus in vitro and in vivo by stable plurilamellar vesicle-encapsulated aminoglycosides. *J. Infect .Dis*. 152: 529-535.

(97) Hernandez-Caselles, T., Vera, A., Crespo, F., Villalain, J. & Gomez-Fernandez, J.C. (1989) Treatment of Brucella melitensis infection in mice by use of liposome-encapsulated gentamicin. *Am. J. Vet. Res*. 50: 1486-1488.

(98) Vitas, A.I., DíÌaz, R. & Gamazo, C. (1996) Effect of composition and method of preparation of liposomes on their stability and interaction with murine monocytes infected with *Brucella abortus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 40:146-151.

(99) Vitas, A.I., Diaz, R. & Gamazo, C. (1997) Protective effect of liposomal gentamicin against systemic acute murine brucellosis. *Chemotherapy*. 43: 204-210.

(100) Prior, S., Gamazo, C., Irache, J.M., Merkle, H.P. & Gander, B. (2000) Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating Brucella infections. *Int. J. Pharm.* 196: 115-125.

(101) Prior, S., Gander, B., Blarer, N., Merkle, H.P., Subira, M.L., Irache, J.M. & Gamazo, C. (2002) In vitro phagocytosis and monocyte–macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Eur. J. Pharm. Sci*. 15: 197-207.

(102) Prior, S., Gander, B., Lecaroz, C., Irache, J.M. & Gamazo, C. (2004) Gentamicin-loaded microspheres for reducing the intracellular Brucella abortus load in infected monocytes. J. *Antimicrob. Chemother*. 53: 981-988.

(103) Lecaroz, C., Blanco-Prieto, M.J., Burell, M.A. & Gamazo, C. (2006) Intracellular killing of Brucella melitensis in human macrophages with microsphere-encapsulated gentamicin. *J. Antimicrob. Chemother*. 58: 549-556.

(104) Kumar, P.V., Asthana, A., Dutta, T. & Jain, N.K. (2006) Intracellular macrophage uptake of rifampicin loaded mannosylated dendrimers. *J. Drug Target*. 14: 546-556.

(105) Chowdhury, M.K.R., Goswami, R. & Chakrabarti, P. (1981) Liposome-entrapped penicillins and growth inhibition in some penicillin-resistant bacteria. *J. Appl. Bacteriol*. 51: 223-227.

(106) Mimoso, I.M., Francisco, A.P.G. & Cruz, M.E.M. (1997) Liposomal formulation of netilmicin. *Int. J. Pharm*. 147:109-117.

(107) Leitzke S., Bucke W., Borner K., Muller R., Hahn H., Ehlers S. (1998). Rationale for and efficacy of prolonged-interval treatment using liposome-encapsulated amikacin in experimental Mycobacterium avium infection. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42:459-461.

(108) Umamaheshwari, R.B., Ramteke, S. & Jain, N.K. (2004).Anti-Helicobacter pylori effect of mucoadhesive nanoparticles bearing amoxicillin in experimental gerbils model. *AAPS PharmSciTech*. 5:e32.

(109) Jikia, D., Chkhaidze, N., Imedashvili, E., Mgaloblishvili,, I., Tsitlanadze G., Katsarava, R., Morris, J.G. & Sulakvelidze, A. (2005) The use if a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant Staphylococcus aureus-infection local radiation injuries caused by exposure to Sr 90. *Clin. Exp. Dermatol*. 30: 23-26.

(110) Lecaroz, M.C., Blanco-Prieto, M.J., Campanero, M.A., Salman, H. & Gamazo, C. (2007) Poly(D,L-lactide-coglycolide) particles containing gentamicin: pharmacokinetics and pharmacodynamics in Brucella melitensis-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51: 1185-1190.

(111) Jeong,Y.I., Na, H.S., Seo, D.H., Kim, D.G., Lee, H.C., Jang, M.K., Na, S.K., Roh, S.H., Kim, S.I. & Nah, J.W. (2008) Ciprofloxacin-encapsulated poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *Int. J. Pharm*. 352: 317-323.

(112) Liu, L., Venkatraman, S.S., Yang, Y.Y., Guo, K., Lu, J., He, B., MóÛchala, S. & Kan, L. (2008) Polymeric micelles anchored with TAT for delivery of antibiotics across the blood-brain barrier. *Biopolymers*. 90: 617-623.

(113) Price, C.I., Horton, J.W. & Baxter, C.R. (1994) Liposome encapsulation: a method for enhancing the effectiveness of local antibiotics. *Surgery*. 115: 480-487.

(114) Castro, G.A. & Ferreira, L.A. (2008) Novel vesicular and particulate drug delivery systems for topical treatment of acne. *Expert Opin. Drug Deliv*. 5: 665-679.

(115) Losa, C., Calvo, P., Castro, E., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (1991) Improvement of ocular penetration of amikacin sulphate by association to poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol*. 43: 548-552.

(116) Frucht-Perry, J., Assil, K.K., Ziegler, E., Douglas, H., Brown, S.I., Schanzlin, D.J. & Weinreb, R.N. (1992) Fibrin-enmeshed tobramycin liposomes: single application topical therapy of *Pseudomonas keratitis*. *Cornea*. 11: 393-397.

(117) Cavalli, R., Gasco, M.R., Chetoni, P., Burgalassi, S. & Saettone, M.F. (2002) Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int. J. Pharm.* 238: 241-245.

(118) Motwani, S.K., Chopra, S., Talegaonkar, S., Kohli, K., Ahmad, F.J. & Khar, R.K. (2008) Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and in vitro characterisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 68: 513-525.

(119) Rauschmann, M.A., Wichelhous, T.A., Stirnal, V., Dingeldein, E., Zichner, L:, Schnettle, R. & Alt, V. (2005) Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials*. 26: 2677-2684.

(120) Putnam, D.A. (1996) Antisense strategies and therapeutic applications. *Am. J. Health-Syst. Pharm*. 52: 151-160.

(121) Duzgunes, N., Pretzer, E., Simoes, S., Slepushkin, V., Konopka, K., Flasher, D. & Pedroso de Lima, M.C. (1999) Liposome-mediated delivery of antiviral agents to human immunodeficiency virus infected cells. *Mol. Membr. Biol*. 16: 111-118.

(122) Martinand-Mari, C., Lebleu, B. & Robbins, I. (2003) Oligonucleotide- based strategies to inhibit human hepatitis C virus. *Oligonucleotides*. 13: 348-539.

(123) Maggon, K. & Barik, S. (2004) New drugs and treatment for respiratory syncytial virus. *Rev. Med. Virol*. 14: 149-168.

(124) Irache, J.M., Merodio, M., Arnedo, A., Camapanero, M.A., Mirchahi, M. & Espuelas, S. (2005) Albumin nanoparticles for the intravitreal delivery of anticytomegaloviral drugs. *Mini Rev. Med. Chem*. 5: 293-305.

(125) Markosian, M. & Hyde, R.M. (2005) Oligonucleotides and polyribonucleotides: a review of antiviral activity. *Antivir. Chem. Chemother*. 16: 91-102.

(126) Boeckh, M. & Boivin, G. (1998) Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin. Microbiol. Rev*. 11: 533-554.

(127) Grundy, J.E., Lui, S.F., Super, M., Berry, N.J., Sweny, P., Fernando, O.N., Moorhead, J. & Griffiths, P.D. (1988) Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients: reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus. *Lancet*. 2(8603): 132-135.

(128) Detrick, B., Nagineni, C.N., Grillone, L.R., Anderson, K.P., Henry, S.P. & Hooks, J.J. (2001) Inhibition of human cytomegalovirus replication in a human re-

tinal epithelial cell model by antisense oligonucleotides. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 163-169.

(129) Meyers, J.D., Ljungman, P. & Fisher, L.D. (1990) Cytomegalovirus excretion as predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J. Infect. Dis.* 162: 373-380.

(130) Giannavola, C., Bucolo, C., Maltese, A., Paolino, D., Vandelli, M.A., Puglisi, G., Lee, V.H. & Fresta, M. (2003) Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-d,l-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm Res.* 20: 584-590.

(131) Fresta, M., Fontana, G., Bucolo, C., Cavallo, G., Giammona, G. & Puglisi, G. (2001) Ocular tolerability and in vivo bioavailability of poly(ethylene glycol) (PEG)-coated polyethyl-2-cyanoacrylate nanosphere-encapsulated acyclovir. *J. Pharm. Sci.* 9: 288-297.

(132) Merodio, M., Arnedo, A., Renedo, M.J. & Irache, J.M. (2001) Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12: 251-259.

(133) Hodge, W.G., Lalonde, R.G., Sampalis, J. & Deschenes, J. (1996) Once-weekly intraocular injections of ganciclovir for maintenance therapy of cytomegalovirus retinitis: clinical and ocular outcome. *J. Infect. Dis.* 174: 393-396.

(134) Cochereau-Massin, I., Lehoang, P., Lautier-Frau, M., Zazoun, L., Marcel, P., Robinet, M., Matheron, S., Katlama, C., Gharakhanian, S. & Rozenbaum, W. (1991) Efficay and tolerance of intravitreal ganciclovir in cytomegalovirus retinitis in AIDS. *Opthalmology.* 98: 1348-1355.

(135) Arnedo, A., Espuelas, S. & Irache, J.M. (2002) Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *Int. J. Pharm.* 244: 59-72.

(136) Merodio, M., Espuelas, M.S., Mirshahi, M., Arnedo, A. & Irache, J.M. (2002) Efficacy of ganciclovir-loaded nanoparticles in human cytomegalovirus (HCMV) infected cells. *J. Drug Target.* 10: 231-238.

(137) Mutwiri, G.W., Nichano, A.K., Babiuk, S. & Babiuk, L.A. (2004) Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *J. Control. Release.* 97: 1-17.

(138) Arnedo, A., Irache, J.M., Merodio, M. & Espuelas, S. (2004) Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide. *J. Control. Release.* 94: 217-227.

(139) Merodio, M., Irache, J.M., Valamanesh, F. & Mirshahi, M. (2002) Ocular disposition and tolerance of ganciclovir-loaded albumin nanoparticles after intravitreal injection in rats. *Biomaterials.* 23: 1587-1594.

(140) Bochot, A., Fattal, E., Boutet, V., Deverre, J.R., Jeanny, J.C., Chacun, H. &, Couvreur, P. (2002) Intravitreal delivery of oligonucleotides by sterically stabilized liposomes. *Investig. Ophtalmol. Vis. Sci*. 43: 253-259.

(141) Fatal, E., De Rosa, G. & Bochot, A. (2004) Gel and solid matrix systems for the controlled delivery of drug carrier-associated nucleic acids. *Int. J. Pharm*. 277: 25-30.

(142) Hu, J., Liu, H. & Wang, L. (2000) Enhanced delivery of AZT to macrophages via acetylated LDL. *J. Control. Release*. 69: 327-335.

(143) Fraternale, A., Casabianca, A., Orlandi, C., Cerasi, A., Chiarantini, L., Brandi, G. & Magnani, M. (2002) Macrophage protection by addition of glutathione (GSH)-loaded erythrocytes to AZT and DDI in a murine AIDS model. *Antiviral Res*. 56: 263-272.

(144) Von Briesen, H., Ramge, P. & Krueter, J. (2000) Controlled release of antiretroviral drugs. *AIDS Rev*. 2: 31-38.

(145) Lôˆbenberg, R., Araujo, L. & Krueter, J. (1997) Body distribution of azidothymidine bound to nanoparticles after oral administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 44: 127-132

(146) Lanao, J.M., Briones, E. & Colino, C.I. (2007) Recent advances in delivery systems for anti-HIV1 therapy. *J. Drug Target*. 15: 21-36.

(147) Katragadda, A., Bridgman, R. & Betageri, G. (2000) Effect of liposome composition and cholesterol on the cellular uptake of stavudine by human monocyte/macrophages. *Cell. Mol. Biol. Lett*. 5: 483-493.

(148) Oussoren, C., Magnani, M., Fraternale, A., Casabianca, A., Chiarantini, L., Ingebrigsten, R., Underberg, W.J. & Storm, G. (1999) Liposomes as carriers of the antiretroviral agent dideoxycytidine-5'-triphosphate. *Int. J. Pharm*. 180: 261-270.

(149) Bender, A.R., von Briesen, H., Kreuter, J., Duncan, I.B. & Rubsamen-Waigmann, H. (1996) Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother*. 40: 1467-1471.

(150) Raulin, J. (2002) Human immunodeficiency virus and host cell lipids. Interesting pathways in research for a new HIV therapy. *Prog. Lipid. Res*. 41: 27-65.

(151) Duzgunes, N., Simoes, S., Slepushkin, V., Pretzer, E., De Clerq, E., Antao, V.P., Collins, M.L. & Pedroso de Lima, M.C. (2001) Enhanced inhibition of HIV-1 replication in macrophages by antisense oligonucleotides, ribozymes and acyclic nucleoside phosphonate analogs delivered in pH sensitive liposomes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 20: 515-523.

(152) Berton, M., Turelli, P., Trono, D., Stein, C.A., Allemann, E. & Gurny, R. (2001) Inhibition of HIV-1 in cell culture by oligonucleotide-loaded nanoparticles. *Pharm. Res.* 18: 1096-1101.

(153) Lambert, G., Fattal, E. & Couvreur, P. (2001) Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. Adv. Drug Deliv. Rev. 47: 99-112.

(154) Hu, Q., Shew, C.R., Bally, M.B. & Madden, T.D. (2001) Programmable fusogenic vesicles for intracellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides: enhanced cellular uptake and biological effects. *Biochim. Biophys. Acta.* 1514: 1-13.

(155) Kunizawa, J., Masuda, T., Katayama, K., Yoshikawa, T., Tsutsumi, Y., Akashi, M., Mayumi, T. & Nakagawa, S. (2005) Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release. J. *Control. Release.* 105: 344-353.

(156) Dembri, A., Montisci, M.J., Gantier, J.C., Chacun, H. & Ponchel, G. (2001) Targeting of 30-azido 30-deoxythymidine (AZT)-loaded poly(isohexylcyanoacrylate) nanospheres to the gastrointestinal mucosa and associated lymphoid tissues. *Pharm. Res.* 18: 467-473.

(157) Boudad, H., Legrand, P., Appel, M., Coconier, M.H. & Ponchel, G. (2001) Formulation and cytotoxicity of combined cyclodextrin poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles on Caco-2 cells monolayers intended for oral administration of saquinavir. *STP Pharm. Sci.* 11: 369-375.

(158) De Jaeghere, F., Allemann, E., Kubel, F., Galli, B., Cozens, R., Doelker, E. & Gurny, R. (2000) Oral bioavailability of a poorly water soluble HIV-1 protease inhibitor incorporated into pH-sensitive particles: effect of the particle size and nutritional state. *J. Control. Release.* 68: 291-298.

(159) Hugle, T. & Cerny, A. (2003) Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis. *Crit. Rev. Med. Virol.* 13: 361-371.

(160) Sookoian, S.C. (2003) New therapies on the horizon for hepatitis C. *Ann. Hepatol.* 2: 164-170.

(161) Papatheodorodis, G.V. & Cholongitas, E. (2004) Chronic hepatitis C and no response to antiviral therapy: potential current and future therapeutic options. *J. Viral Hepatitis.* 11: 287-296.

(162) Shiffman, M.L. (2004) Retreatment of patients who do not respond to initial therapy for chronic hepatitis C. *Clevel. Clin. J. Med.* 71: S13-S16.

(163) Segura, S., Gamazo, C., Irache, J.M. & Espuelas, S. (2007) Gamma interferon loaded onto albumin nanoparticles: in vitro and in vivo activities against *Brucella abortus*. *Antimicrob. Agent Chemother.* 51: 1310-1314

(164) World Health Organisation. Diabetes, http://www.who.int/, (acceso el 26/12/2008).

(165) Tanaka, S.I., Yamakawa, T., Aoki, I., Okuda, K. & Mobbs, C. (2004) Daily nasal inoculation with the insulin gene ameliorates diabetes in mice. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 63: 1-9.

(166) Gomez-Perez, F. & Rull, J.A. (2005) Insulin therapy: current alternatives. *Arch. Med. Res.* 36: 258-72.

(167) MuñÒoz-Torres, M., Alonso, G. & Raya, M.P. (2004) Calcitonin therapy in osteoporosis. *Treat. Endocrinol.* 3: 117-132.

(168) Cao, Y. & Lam, L. (2002) Projections for insulin treatment for diabetics. *Drugs Today.* 38: 419-427.

(169) Prego, C., Garcia, M., Torres, D. & Alonso, M.L. (2005) Transmucosal macromolecular drug delivery. *J. Control. Release.* 101: 151-162.

(170) Saffran, M., Pansky, B., Budd, G. & Williams, F.E. (1997) Insulin and the gastrointestinal tract. *J. Control. Release.* 46: 89-98.

(171) Dapergolas, G. & Gregoriadis, G. (1976) Hypoglycemic effect of liposome-entrapped insulin administered intragastrically into rats. *Lancet.* 2: 824-827.

(172) Patel, H.M. & Ryman, B.E. (1976) Oral administration if insulin by encapsulation in liposomes. *FEBS Lett.* 62: 60-63.

(173) Couvreur, P., Lenaerts, V., Kante, B., Roland, M. & Speiser, P. (1980) Oral and parenteral administration of insulin associated to hydrolysable nanoparticles. *Acta Pharm. Tech.* 26: 220-222.

(174) Kisel, M.A., Kulik, L.N., Tsybovsky, I.S., Vlasov, A.P., Vorobyov, M.S., Kholodava, E.A. & Zabarovskaca, Z.V. (2001) Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *Int. J. Pharm.* 216: 105-114.

(175) Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P. & Vauthier, C. (2002) Nanocapsule technology: a review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 19: 99-134.

(176) Katayama, K., Kato, Y., Onishi, H., Nagai, T. & Machida, Y. (2003) Double liposomes: hypoglycemic effects of liposomal insulin on normal rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29: 725-731.

(177) Csaba, N., Gonzalez, L., Sanchez, A. & Alonso, M.J. (2004) Design and characterisation of new nanoparticulate polymer blends for drug delivery. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15: 1137-1151.

(178) Simon, M., Wittmar, M., Kissel, T. & Linn, T. (2005) Insulin containing nanocomplexes formed by self-assembly from biodegradable amine-modified

poly(vinyl alcohol)-graftpoly(L-lactide): bioavailability and nasal tolerability in rats. *Pharm. Res.* 22: 1879-1886.

(179) Mao, S., Germerhaus, O., Fischer, D., Linn, T., Schnepf, R. & Kissel, T. (2005) Uptake and transport of PEG-graft-trimethyl-chitosan copolymer-insulin nanocomplexes by epithelias cells. *Pharm. Res.* 22: 2058-2068.

(180) Garcia-Fuentes, M., Torres, D &, Alonso, M.J. (2005) New surface modified lipid nanoparticles as delivery vehicle for salmon calcitonin. *Int. J. Pharm.* 296: 122-132.

(181) Arbos, P., Campanero, M.A., Arangoa, M.A. & Irache, J.M. (2004) Nanoparticles with specific bioadhesive properties to circumvent the pre-systemic degradation of fluorinated pyrimidines. *J. Control. Release.* 96: 55-65.

(182) Salman, H. Gamazo, C., Campanero, M.A. & Irache, J.M. (2006) Bioadhesive mannosylated nanoparticles for oral drug delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 3203-3209.

(183) Pinto-Alphandary, H., Aboubakar, M., Jaillard, D., Couvreur, P. & Vauthier, C. (2003) Visualization of insulin-loaded nanocapsules: In vitro and in vivo studies after oral administration to rats. *Pharm. Res.* 20: 1071-1084.

(184) Florence, A.T., Hillery, A.M., Hussain, N. & Jani, P.U. (1995) Factors affecting the oral uptake and translocation of polystyrene nanoparticles: histological and analytical evidence. *J. Drug Target.* 3: 65-70.

(185) Yin, Y., Chen, D., Qiao, M., Wei, X. & Hu, H. (2007) Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution. *J. Control. Release.* 123: 27-38.

(186) Woitiski, C.B., Carvalho, R.A., Ribeiro, A.J., Neufeld, R.J. & Veiga, F. (2008) Strategies toward the improved oral delivery of insulin nanoparticles via gastrointestinal uptake and translocation. *BioDrugs.* 22: 223-237.

(187) Zhang, N., Ping, Q.N., Huang, G.H. & Xu, W.F. (2005) Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. *Int. J. Pharm.* 294: 247-259.

(188) Centelles, M., Qiang, C., Campanero, M.A. & Irache, J.M. (2008) New methodologies to characterize the effectiveness of the gene transfer mediated by DNA-chitosan nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* On line early 08/10/2008.

(189) Ferraris, R.P., Villenas, S.A. & Diamond, J. (1992) Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. *Am. J. Physiol.* 262: 1047-1059.

(190) Sayani, A.P. & Chien, Y.W. (1996) Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 13: 85-184.

(191) Foster, K.J., Griffith, A.H., Dewbury, K., Price, C.P. & Wright, R. (1980) Liver disease in patients with diabetes mellitus. *Postgrad. Med. J.* 56: 767-772.

(192) Zhu, Y.Y., Zhang, Y., Hong, X.L., Dong, J.F. & Xia, B.L. (2006) Influence of Emulsifiers on the Synthesis of Insulin-loaded Nanocapsules in Double Emulsion. *Chin. J. Chem.* 24: 109-113.

(193) Lin, Y.H., Mi, F.L., Chen, C.T., Chang, W.C., Peng, S.F., Liang, H.F. & Sung, H.W. (2007) Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules*. 8: 146-152.

(194) Damge, C., Michel, C., Aprahamian, M. & Couvreur, P. (1988) New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes*. 37: 246-251.

(195) Damge, C., Vranckx, H., Balschmidt, P. & Couvreur, P. (1997) Poly(alkyl cyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. *J. Pharm. Sci.* 86: 1403-1409.

(196) Mesiha, M.S., Sidhom, M.B. & Fasipe, B. (2005) Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 288: 289-293.

(197) Hou, Z.Q., Zhang, Z.X., Xu, Z.H., Zhang, H., Tong, Z.F. & Leng, Y.S. (2005) The stability of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles in an oily medium and the hypoglycemic effect in diabetic rats. *Yao Xue Xue Bao*. 40: 57-64.

(198) Carino, G.P., Jacob, J. S. & Mathiowitz, E. (2000) Nanosphere based oral insulin delivery. *J. Control. Release*. 65: 261-269.

(199) Cui, F., Shi, K., Zhang, L., Tao, A. & Kawashima, Y. (2006) Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *J. Control. Release*. 114: 242-250.

(200) Cui, F.D., Tao, A.J., Cun, D.M., Zhang, L.Q. & Shi, K. (2007) Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery. *J. Pharm. Sci.* 96: 421-427.

(201) Ma, Z., Lim, T.M. & Lim, L.Y. (2005) Pharmacological activity of peroral chitosan–insulin nanoparticles in diabetic rats. *Int. J. Pharm.* 293: 271-280.

(202) Pan, Y., Li, Y.J., Zhao, H.Y., Zheng, J.M., Xu, H., Wei, G., Hao, J.S. & Cui, F.D. (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* 249: 139-147.

(203) Pan, Y., Zheng, J.M., Zhao, H.Y., Li, Y.J., Xu, H. & Wei, G. (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* 249: 139-147.

(204) Zhang, N., Ping, Q., Huang, G., Xu, W., Chen, Y. & Han, X. (2006) Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *Int. J. Pharm.* 327: 153-159.

(205) Chalasani, K.B., Russell-Jones, G.J., Yandrapu, S.K., Diwan, P.V. & Jain, S.J. (2007). A novel vitamin B12-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin. *J. Control. Release.* 117: 421-429.

(206) Damge, C., Maincent, P. & Ubrich, N. (2007) Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *J. Control. Release.* 117: 163-170.

(207) Damge, C., Michel, C., Aprahamian, M., Couvreur, P. & Devissaguet, J.P. (1990) Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. *J. Control. Release.* 13: 233-239.

(208) Damge, C., Hillaire-Buys, D., Puech, R., Hoeltzel, A., Michel, C. & Ribes, G. (1995) Effects of orally administered insulin nanocapsules in normal and diabetic dogs. *Diabetes Nutr. Metab.* 8: 3-9.

(209) Watnasirichaikul, S., Rades, T., Tucker, I.G. & Davies, N.M. (2002) In-vitro release and oral bioactivity of insulin in diabetic rats using nanocapsules dispersed in biocompatible microemulsion. *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 473-480.

(210) Sai, P., Damage, C., Rivereau, A.S., Hoeltzel, A. & Gouin, E. (1996) Prophylactic oral administration of metabolically active insulin entrapped in isobutylcyanoacrylate nanocapsules reduces the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Autoimmun.* 9: 713-722.

(211) Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-Alphandary, H. & Couvreur, P. (2003) Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 519-548.

(212) Aboubakar, M., Puisieux, F., Couvreur, P. & Vauthier, C. (1999) Physico-chemical characterization of insulin-loaded poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization. *Int. J. Pharm.* 183: 63-66.

(213) Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K. & Nagai, T. (1999) Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25: 471-476.

(214) Santos, C.A., Freedman, B.D., Leach, K.J., Press, D.L., Scarpulla, M. & Mathiowitz, E. (1999) Poly(fumaric–co-sebacic anhydride) A degradation study as evaluated by FTIR, DSC, GPC and X-ray diffraction. *J. Control. Release.* 60: 11-22.

(215) Thanou, M., Verhoef, J.C. & Junginger, H.E. (2001) Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52: 117-126.

(216) AnóÛnimo. (2008) Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 15: 584-602.

(217) Sociedad EspañÒola de ReumatologíÌa. http://www.ser.es/ (acceso el 8/01/2009)

(218) San, Yoo H. & Park, G.T. (2004) Biodegradable nanoparticles containing protein-fatty acid complexes for oral delivery of salmon calcitonin. *J. Pharm. Sci.* 93: 488-495.

(219) Sakuma, S., Suzuki, N., Kikuchi, H., Hiwatari, K., Arikawa, K., Kishida, A. & Akashi, M. (1997) Oral peptide delivery using nanoparticles composed of novel graft copolymers having hydrophobic backbone and hydrophilic branches. *Int. J. Pharm.* 149: 93-106.

(220) Sakuma, S., Suzuki, N., Kikuchi, H., Hiwatari, K., Arikawa, K., Kishida, A. & Akashi, M. (1997) Absorption enhancement of orally administered salmon calcitonin by polystyrene nanoparticles having poly(N-isopropylacrylamide) branches on their surfaces. *Int. J. Pharm.* 158: 69-78.

(221) Sakuma, S., Suzuki, N., Sudo, R., Hiwatari, K., Kishida, A. & Akashi, M. (2002) Optimized chemical structure of nanoparticles as carriers for oral delivery of salmon calcitonin. *Int. J. Pharm.* 239: 185-195.

(222) Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H. & Kuno, Y. (2000) Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin. *Pharm. Dev. Technol.* 5: 77-85.

(223) Prego, C., GarcíÌa, M., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) Transmucosal macromolecular drug delivery. *J. Control. Release*. 101: 151-162.

(224) Garcia-Fuentes, M., Prego, C., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25: 133-143.

(225) Prego, C., Torres, D., Fernadez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., QuiñÒoa, E. & Alonso, M.J. (2006) Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery. Effect of chitosan pegylation degree. *J. Control. Release*. 111: 299-308.

(226) Lowe, P.J. & Tample, C.S. (1994) Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 46:547-552.

(227) Vranckx, H., Demoustier, M. & Deleers, M. (1996) A new nanocapsule formulation with hydrophilic core: Application to the oral administration of salmon calcitonin in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42: 345-347.

(228) Sinko, P.J., Lee, Y.H., Makhey, V., Leesman, G.D., Sutyak, J.P., Yu, H., Perry, B., Smith, C.L., Hu, P., Wagner, E.J., Falzone, L.M., McWhorter, L.T., Gilligan, J.P. & Stern, W. (1999) Biopharmaceutical approaches for developing and assessing oral peptide delivery strategies and systems: in vitro permeability and in vivo oral absorption of salmon calcitonin. *Pharm. Res.* 16: 527-533.

(229) Hastewell, J., Lynch, S., Williamson, I., Fox, R. & Mackay, M. (1992) Absorption of human calcitonin across the rat colon in vivo. *Clin Sci (Lond).* 82: 589-594.

(230) Takeuchi, H., Matsui, Y., Yamamoto, H. & Kawashima, Y. (2003) Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. *J. Control. Release.* 86: 235-242.

(231) Behrens, I., Vila Pena, A.I., Alonso, M.J. & Kissel, T. (2002) Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport. *Pharm. Res.* 19: 1185-1193.

(232) Prego, C., Fabre, M., Torres, D. & Alonso, M.J. (2006) Efficacy and mechanims of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. *Pharm. Res.* 23: 549-556.

(233) Fernandez-Urrusuno, R., Calvo, P., RemuñÒan-Lopez, C., Vila-Lato, J.L. & Alonso, M.J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* 16: 1576-1581.

(234) Vila, A., Gill, H., McCallion, O. & Alonso, M.J. (2004) Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *J. Control. Release.* 98: 231-244.

(235) Simon, M., Wittmar, M., Kissel, T. & Linn, T. (2005) Insulin containing nanocomplexes formed by self-assembly from biodegradable amine-modified poly(vinyl alcohol)-graftpoly(L-lactide): bioavailability and nasal tolerability in rats. *Pharm. Res.* 22: 1879-1886.

(236) Tanaka, S.I., Yamakawa, T., Aoki, I., Okuda, K. & Mobbs, C. (2004) Daily nasal inoculation with the insulin gene ameliorates diabetes in mice. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 63: 1-9.

(237) Vermehren, C., Frokjaer, S., Aurstad, T. & Hansen, J. (2006) Lung surfactant as a drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 307: 89-92.

(238) Li, Y. & Mitra, A.K. (1996) Effects of phospholipid chain length, concentration, charge and vesicle size on pulmonary insulin absorption. *Pharm. Res.* 13: 76-79.

(239) Ford, J., Woolfe, J. & Florence, A.T. (1999) Nanospheres of cyclosporin A: poor oral absorption in dogs. *Int. J. Pharm.* 183: 3-6.

(240) Liu, H., Wang, Y. & Li, S. (2007) Advanced delivery of ciclosporin A: present state and perspective. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 4: 349-358.

(241) Czogalla, A. (2009) Oral cyclosporine A - the current picture of its liposomal and other delivery systems. *Cell Mol. Biol. Lett.* 14: 139-152.

(242) Molpeceres, J., Chacón, M., Guzmán, M., Berges, L. & Aberturas, M.R. (1999) A polycaprolactone nanoparticle formulation of cyclosporin-A improves the prediction of area under the curve using a limited sampling strategy. *Int. J. Pharm.* 187: 101-113.

(243) Molpeceres, J., Chacón, M., Guzmán, M. & Aberturas, M.R. (2000) Dependency of cyclosporine tissue distribution and metabolism on the age and gender of rats after a single intravenous dose. Int. J. Pharm. 197: 129-141.

(244) Varela, M.C., Guzmán, M., Molpeceres, J., Aberturas, M.R., Rodriguez-Puyol, D. & Rodriguez-Puyol, M. (2001) Cyclosporine-loaded polycaprolactone nanoparticles: immunosuppression and nephrotoxicity in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12: 471-478.

(245) Goldstein, G., Scheid, M.P., Boyse, E.A., Schlesinger, D.H. & Wauwe, V.J. (1979) A synthetic entapeptide with biological activity characteristic of the thymic hormone thymopoietin. *Science.* 204: 1309-1310.

(246) Colle, R., Ceschia, T., Colatritto, A. & Biffoni, F. (1988) Use of thymopentin in autoimmune hemolytic anemia due to chronic lymphocytic leukemia. *Curr. Ther. Res.* 44: 1045-1049.

(247) Bernengo, M.G., Doveil, C.G., Meregalli, M., Appino, A. & Massobrio, R. (1988) Immunomodulation and Sezary syndrome: experience with thymopentin (TP-5). *Br. J. Dermatol.* 119: 207-221.

(248) Faist, M., Ertel, W., Salmen, B., Weiler, A., Ressel, C., Bolla, K. & Heberer, G. (1988) The immune-enhancing effect of perioperative thymopentin administration in elder patients undergoing major surgery. *Arch. Surg.* 123: 1449-1453.

(249) Yin, Y., Chen, D., Qiao, M., Lu, Z. & Hu, H. (2006) Preparation and evaluation of lectin-conjugated PLGA nanoparticles for oral delivery of thymopentin. *J. Control. Release.* 116: 337-345.

(250) Yuan, X.J., Zhang, Z.R., Song, Q.G. & He, Q. (2006) Research on thymopentin loaded oral N-trimethyl chitosan nanoparticles. *Arch. Pharm. Res.* 29: 795-799.

(251) Zheng, A.P., Wang, J.C., Lu, W.L., Zhang, X., Zhang, H., Wang, X.Q. & Zhang, Q. (2006) Thymopentin-loaded pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral administration: preparation, characterization, and pharmacodynamics. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 2936-2944.

(252) Lallemand, F., O. Felt-Baeyens, O., K. Bessenghir, K., F. Behar-Cohen, F. & Gurny, R. (2003) Cyclosporin A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56: 307-318.

(253) Bertelmann, E. & Pleyer, U. (2004) Immunomodulatory therapy in ophthalmology – is there a place for topical application? *Ophthalmologica*. 218: 359-367.

(254) Yenice, I., Mocan, M.C., Palaska, E., Bochot, A., Bilensoy, E., Vural, I., IrkeçÁ, M. & Hincal, A.A. (2008) Hyaluronic acid coated poly-epsilon-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. *Exp. Eye Res.* 87: 162-167.

(255) Gokce, E.H., Sandri, G., Bonferoni, M.C., Rossi, S., Ferrari, F., Gü¸neri, T. & Caramella, C. (2008) Cyclosporine A loaded SLNs: evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity. *Int. J. Pharm.* 364: 76-86.

(256) Milani, J.K., Pleyer, U., Dukes, A., Chou, H.J., Lutz, S., Ruckert, D., Schmidt, K.H. & Mondino, B.J. (1993) Prolongation of corneal allograft survival with liposome-encapsulated cyclosporin in the rat eye. *Ophthalmology.* 100: 890-896.

(257) De Campos, A.M., Sanchez, A. & Alonso, M.J. (2001) Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* 224: 159-168.

(258) Short, B.G. (2008) Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. *Toxicol Pathol.* 36: 49-62.

(259) De Kozac, Y., Andrieux, K., Villarroya, H., Klein, C., Thillaye-Goldenberg, B., Naud, M.C., Garcia, E. & Couvreur, P. (2004) Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles: a new treatment of experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur. J. Immunol.* 34: 3702-3712.

(260) Schmidt, J., Metselaar, J.M., Wauben, M.H., Toyka, K.V., Storm, G. & Gold, R. (2003) Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. *Brain* 126: 1895-1904.

(261) Merodio, M., Irache, J. M., Eclancher, F., Mirshahi, M. & Villarroya, H. (2000) Distribution of albumin nanoparticles in animals induced with the experimental allergic encephalomyelitis. *J. Drug Target.* 8: 289-303.

(262) Cornford, E.M. & Hyman, S. (1999) Blood–brain barrier permeability to small and large molecules. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 36: 145-163.

(263) Bodor, N. & Buchwald, P. (1999) Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36: 229-254.

(264) Rousseau, V., Denizot, B., Le Jeune, J.J. & Jallet, P. (1999) Early detection of liposome brain localization in rat experimental allergic encephalomyelitis. *Exp. Brain Res.* 125: 255-264.

(265) Villarroya, H., Marie, Y., Ouallet, J.C., Le Saux, F., Tchelingerian, J.L. & Baumann, N. (1997) Expression of TNF alpha in central neurons of Lewis rat spinal cord after EAE induction. *J. Neurosci. Res.* 49: 592-599.

(266) Calvo, P., Gouritin, B., Villarroya, H., Eclancher, F., Giannavola, C., Klein, C., Andreux, J.P. & Couvreur, P. (2002) Quantification and localization of PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles in brain and spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 15: 1317-1326.

(267) Ammoury, N., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Dubrasquet, M. & Benita, S. (1991) Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(d,llactide) and poly(isobutyl-cyanoacrylate) nanocapsules in rats. *Pharm. Res.* 8: 101-105.

(268) Fawaz, F., Bonini, F., Guyot, M., Lagueny, A.M., Fessi, H. & Devissaguet, J.P. (1993) Influence of poly(DL-lactide) nanocapsules on the biliary clearance and enterohepatic circulation of indomethacin in the rabbit. *Pharm. Res.* 10: 750-756.

(269) Cattani, V.B., Pohlmann, A.R. & Dalla Costa, T. (2008) Pharmacokinetic evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules. *Int. J. Pharm.* 363: 214-216.

(270) Bernardi, A., Frozza, R.L., Jä‰ger, E., FigueiróÛ, F., Bavaresco, L., Salbego, C., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. & Battastini, A.M. (2008) Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules aganst glioma cell lines: an in vitro study. *Eur. J. Pharmacol.* 586: 24-34.

(271) Guterres, S.S., Fessi, H., Barratt, G., Puisieux, F. & Devissaguet, J.P. (1995) Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing nonsteroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharm. Res.* 12: 1545-1547.

(272) Guterres, S.S., Fessi, H., Barratt, G., Puisieux, F. & Devissaguet, J.P. (2000) Poly(rac-lactide) nanocapsules containing diclofenac: protection against muscular damage in rats. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11: 1347-1355.

(273) Calvo, P., Alonso, M.J., Vila-Jato, J.L. & Robinson, R. (1996) Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 1147-1152.

(274) Bucolo, C., Maltese, A., Plugisi, G. & Pignatello, R. (2002) Enhanced ocular anti-inflammatory activity of ibuprofen carried by an Eudragit RS100 nanoparticle suspension. *Ophthalmic. Res.* 34: 319-323.

(275) Badawi, A.A., El-Laithy, H.M., El Qidra, R.K., El Mofty, H. & El dally M. (2008) Chitosan based nanocarriers for indomethacin ocular delivery. *Arch. Pharm Res.* 31: 1040-1049.

(276) Jiang, B., Hu, L., Gao, C. & Shen, J. (2005) Ibuprofen-loaded nanoparticles prepared by a co-precipitation method and their release properties. *Int. J. Pharm.* 304: 220-230.

(277) Heffernan, M.J. & Murthy, N. (2005) Polyketal nanoparticles: a new pH-sensitive biodegradable drug delivery vehicle. *Bioconjug. Chem.* 16: 1340-1342.

(278) Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G. & Cooper, E.R. (2003) Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 18: 113-120.

(279) Eidelman, A., Weiss, J.M., Lau, J. & Carr, D.B. (2005) Topical anaesthetics for dermal instrumentation: a systematic review of randomized, controlled trials. *Ann. Emerg. Med.* 46: 343-351.

(280) Taddio, A., Soin, H.K., Schuh, S., Koren, G. & Scolnik, D. (2005) Liposomal lidocaine to improve procedural success rates and reduce procedural pain among children: a randomized controlled trial. *CMAJ.* 172: 1691-1695.

(281) Viscusi, E.R. (2004) Emerging techniques in the treatment of postoperative pain. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 61: S11-S14.

(282) Viscusi, E.R., Martin, G., Hartrick, C.T., Singla, N. & Manvelian, G. (2005) The EREM Study group Forty-eight hours of postoperative pain relief after total hip arthroplasty with a novel, extended-release epidural morphine formulation. *Anesthesiology.* 102: 1014-1022.

(283) Grant, S.A. (2002) The holy grail: long acting local anaesthetics and liposomes. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 16: 345-352.

(284) Mantripragada, S. (2002) A lipid based depot (DepoFoam technology) for sustained release drug delivery. *Prog. Lipid Res.* 41: 392-406.

(285) Vaughan, C. (2008) Development and implementation of a process to ensure safe use of morphine sulfate extended-release liposome injection. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 65: 458-456.

(286) Lamprecht, A., Saumet, J.L., Roux, J. & Benoit, J.P. (2004) Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int. J. Pharm.* 278: 407-414.

(287) Betbeder, D., Sperandio, S., Latapie, J.P., De Nadai, J., Etienn, A., Zajac, J.M. & Frances, B. (2000) Biovector nanoparticles improve antinociceptive efficacy of nasal morphine. *Pharm. Res.* 17: 743-748.

(288) Wolka, A.M., Huber, J.D. &Davis, T.P. (2003) Pain and the blood-brain barrier: obstacles to drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55: 987-1006.

(289) Pardridge, W.M. (1999) Vector-mediated drug delivery to the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36: 299-321.

(290) Pardridge, W.M. (2007) Drug targeting to the brain. *Pharm Res*. 24: 1733-1744.

(291) Olivie,r J.C. (2005) Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx*. 2: 108-119.

(292) Patel, M.M., Goyal, B.R., Bhadada, S.V., Bhatt, J.S. & Amin, A.F. (2009). Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. *CNS Drugs*. 23: 35-58.

(293) Kreuter, J. (2004) Influence of the surface properties on nanoparticle mediated transport of drugs to the brain. *J. Nanosci. Nanotechnol*. 4: 484-488.

(294) Kreuter, J. & Gelperina, S. (2008) Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori*. 94: 271-277.

Socios de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia a quien expresamos nuestra sincera gratitud por su mecenazgo:

CAJA MADRID

Farmaindustria

Roche Farma

Laboratorios Janssen-Cilag
Alcaliber S.A.
Almirall, S.A.
Bristol-Myers Squibb, S.L.
Grupo Ferrer Internacional
Laboratorios Esteve
Laboratorios MSD
Laboratorios Rovi
Novartis Farmacéutica
Tedec-Meiji Farma S.A.
Sanofi-Aventis
Laboratorios Menarini

Aragofar

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos
Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid

Colegios Oficiales de Farmacéuticos de: A Coruña, Alicante, Badajoz, Barcelona, Bizkaia, Burgos, Cáceres, Cádiz, Ciudad Real, Girona, Palencia, Principado de Asturias, Santa Cruz de Tenerife, Tarragona, Toledo y Zaragoza.