

# **ESTRATEGIAS FARMACÉUTICAS PARA LA FORMULACIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS**

DISCURS

llegit a l'acte d'ingrés de l'Acadèmic Corresponent

**Il·lustre Sr. Dr. Juan Manuel Irache Garreta**

Celebrat el dia 4 d'abril de 2016

Presentació a càrrec de l'Acadèmic Numerari

**Excel·lentíssim Sr. Dr. Miquel Ylla-Català Genís**

Barcelona

2016

*L'Acadèmia no es fa solidària de  
les opinions que s'exposen en les  
publicacions, de les quals és responsable  
l'autor:*

**Excel·lentíssim Senyor President,  
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,  
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,  
Senyores i senyors,**

La tasca de presentar un nou acadèmic és sempre gratificant. La incorporació de nous valors que estimen i dignifiquen la professió farmacèutica, es una de les millors eines que té aquesta Acadèmia per complir els manaments estatutaris i garantir a la Institució un futur de qualitat i un nivell científic d'acord amb les exigències actuals. Moltes gràcies a la junta de Govern d'aquesta Acadèmia que m'hagi avui designat per la presentació d'un nou acadèmic:

El Dr. Juan Manuel Irache Garreta.

Una de las actividades profesionales farmacéuticas más satisfactorias en las que he participado la propició mi designación por el ministerio de Sanidad como ponente en las Comisiones preparatorias de las especialidades farmacéuticas de Farmacia Industrial y Galénica y de Análisis de Medicamentos y Drogas. No solo por la aportación que se me facilitaba para colaborar en unos temas profesionales que había vivido durante muchos años en mi actividad profesional sino también por la calidad humana y científica de las personas que se integraron en ambas Comisiones. Sirva como ejemplo de esta afirmación que hoy seis de los miembros de ambas Comisiones están como académicos de esta real Corporación aportando los valores de su riqueza científica y de su diversidad. El último de esta lista es el nuevo académico cuya presentación se me ha encargado.

Juan Manuel Irache nació en Lérida en el año 1964, es licenciado y doctor en Farmacia por la Universidad de Navarra. Es especialista en “Farmacia Industrial y galénica”, en “Análisis de Medicamentos y Drogas” y “Habilité à Diriger des Recherches” (HdR).

Su formación científica y farmacéutica ha transcurrido con prioridad en

la Universidad de Navarra y diferentes centros de Francia. Entre 1987 y 1990 realiza su Tesis Doctoral bajo la dirección del Prof. Félix Alvarez de la Vega con un estudio de la capacidad protectora de diferentes antioxidantes en productos grasos. Realiza una estancia post doctoral en el Departamento de Farmacia Galénica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Paris-Sud XI dirigido por el profesor Francis Puisieux donde hace un estudio de la capacidad bioadhesiva de sistemas nanoparticulados en la mucosa intestinal bajo la dirección de la prof. Dominique Duchêne la única mujer que ha ocupado la presidencia de la “Académie National de Pharmacie”.

El año 1993 obtiene por oposición una plaza de “Maître des Conférences Universitaire” en la Universidad de Rouen e imparte docencia en el “Conservatoire National des Arts et Métiers” de París hasta el año 1996. Año en que se incorpora en la Universidad de Navarra como profesor de Tecnología Farmacéutica donde ejerce actualmente como catedrático.

Formó parte de la comisión promotora de la especialidad farmacéutica de Farmacia Industrial y Galénica y en la actualidad es vocal de la Comisión Nacional de la Especialidad. Ha sido miembro de la Junta directiva de la “Association de Pharmacie Galénique Industrielle”, presidente de la “Spanish. Portuguese Local Chapter de la Controlled Release Society”, y de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (SEFIG), ha formado parte del “Board of Pharmaceutical Sciences” de la Federación Internacional farmacéutica (FIP) y es miembro correspondiente europeo de la “Académie National de Pharmacie” de París.

Es (co)-autor de más de 150 artículos en revistas científicas internacionales 25 capítulos en libros de la especialidad y ha participado en 15 invenciones patentadas así como ha dirigido o co-dirigido 22 tesis doctorales y 14 estancias post doctorales.

A toda esta brillante trayectoria el Dr. Irache añade hoy a su curriculum la pertenencia como miembro correspondiente a esta “Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya”.

En la actualidad su investigación está relacionada con el diseño de sistemas de administración de fármacos y moléculas activas a través de barreras biológicas y el desarrollo y la evaluación de nuevos adyuvantes mucosales para vacunación en inmunoterapia.

Su discurso de entrada en esta Academia, es un avance de los trabajos en los que actualmente dedica su pasión investigadora “Estrategias farmacéuticas para la formulación de Péptidos y Proteínas”.

Tema que cabe situarlo dentro del concepto más puro de quehacer farmacéutico, en la acción del galénico que convierte el principio activo en medicamento administrable y en un porvenir terapéutico en el que el producto biológico, como los péptidos y las proteínas, producto en definitiva afín a las células del organismo dañado que pretende beneficiar, abre un nuevo capítulo en la ciencia del curar con el arsenal de productos procedentes de la biotecnología buscando caminos más adecuados y más fáciles para su administración que redunden en su efectividad y en la calidad de la vida del enfermo.

Esta presentación no tiene como objetivo adelantar comentarios, todos los presentes seremos testimonios de su trabajo.

Será un placer escucharlo.



**Excel·lentíssim Senyor President,  
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,  
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,  
Senyores i senyors,**

En primer lloc vull expressar la meua satisfacció i el meu profund agraïment a la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya i especialment als Molt Il·lustres Acadèmics María Angels Calvo, Antonio Esteve Cruella i Joan Uriach Marsal, per haver-me proposat com a nou acadèmic corresponent. També voldria agrair, de manera molt particular, al Dr. Miquel Ylla-Catalá i Genis, per les seves paraules de presentació. Igualment, vull expressar-ho a tots el membres de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya. És per a mi un gran honor i un motiu d'orgull, poder ser membre corresponent d'aquesta prestigiosa Institució. Em tenen a la vostra disposició per participar de manera activa en les diferents activitats promogudes per l'Acadèmia i la seva Junta de Govern. Espero poder complir dignament les responsabilitats que implica aquest nomenament.

Quiero mostrar mi agradecimiento más sincero a todas aquellas personas que me han acompañado en mi vida profesional en la Universidad de Navarra, la “Université de Paris Sud-XI”, el “Conservatoire National des Arts et Métiers”, y la “Université de Rouen”, donde he desempeñado diversas tareas académicas y/o de investigación como Ayudante, Post-doc, “Maître des Conférences Universitaire” o Profesor. Aunque son muchas las personas a las que podría citar en agradecimiento por su apoyo y cariño, quiero reconocer de forma más particular al Prof. Félix Alvarez de la Vega por abrirme el mundo de la investigación farmacéutica cuando me iniciaba en ella, así como al Prof. Francis Puisieux y a la Prof. Dominique Duchêne por aceptarme en su Laboratorio e introducirme en el mundo de las nanomedicinas. Igualmente me siento muy agradecido por las indicaciones y asesoramiento de la Prof. Pilar Ygartua, el Prof. Daniel Fos y la Prof. Anne Marie Orecchioni, maestros todos ellos que intenta-

ron adiestrarme en el difícil arte de la docencia universitaria.

También, si me lo permiten, quisiera acordarme en este Acto de la Especialidad de Farmacia Industrial y Galénica y, especialmente, de todas las personas que han participado y participan en su desarrollo, implementación y consolidación. Esta Especialidad, desde mi punto de vista, ha contribuido enormemente al entendimiento y el establecimiento de puentes, así como de relaciones fructuosas, entre la Universidad y la Industria Farmacéutica. Esta colaboración, que debe mantenerse y potenciarse, es básica y clave para obtener mejoras tanto de innovación como de formación que redunden en beneficio para ambos actores y, por supuesto, para la Sociedad. En este punto, quiero recordar, particularmente, al Dr. José Carlos Montilla, al Dr. Miquel Ylla-Catalá, al Prof. José Domenech y, de forma muy particular puesto que ya no está con nosotros, al Dr. Francesc Taxonera Roca. Gracias por vuestro tiempo, consejos y enseñanzas.

Igualmente no puedo olvidar hoy a todos mis colaboradores y colegas con los cuales he tenido (y tengo) el placer de discutir y debatir desde el punto de vista intelectual la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, basadas en la formulación, que contribuyan a la mejora de los tratamientos actuales, especialmente en los campos de la administración de anticancerosos, las vacunas y los medicamentos para enfermedades desatendidas.

Finalmente, no quisiera terminar esta salutación sin un recuerdo emotivo y personal para todas aquellas personas que ocupan un lugar central en mi vida y que han contribuido a que nos encontremos hoy aquí. Me refiero a mi Familia. Algunas ya no están con nosotros, pero sé que estarían muy orgullosos de poder acompañarme en estos momentos. En este pequeño homenaje quiero acordarme de mis padres, mis primeros maestros en la vida, mis hermanos y, en particular, a mi esposa Isabel Ezpeleta Otamendi, también doctora en Farmacia, y a mis hijas Ana y María; por su apoyo, comprensión, estímulo y cariño. Gracias por vuestra paciencia.



## Índice

1. Introducción .....	pág. 11
2. Administración parenteral.....	pág. 15
2.1. Formas líquidas de administración parenteral .....	pág. 15
2.2. Formas sólidas de administración parenteral .....	pág. 20
2.3. Fabricación y acondicionamiento de preparaciones parenterales .....	pág. 22
2.4. Formas parenterales de liberación controlada .....	pág. 24
3. Administración a través de mucosas.....	pág. 40
3.1. Administración pulmonar. ....	pág. 40
3.2. Administración nasal .....	pág. 44
3.3. Administración bucal .....	pág. 46
3.4. Administración oral .....	pág. 47
4. Conclusiones .....	pág. 50
5. Bibliografía .....	pág. 50

## Abreviaturas

p.ej.:	por ejemplo
agua pi:	agua para inyectables
PEG:	polietilenglicol
PEGs:	polietilenglicoles
HCl:	ácido clorhídrico
NaOH:	hidróxido sódico
SC:	subcutánea
IV:	intravenosa
IM:	intramuscular
JP:	jeringa precargada
AU:	autoinyector
ZnCl <sub>2</sub> :	cloruro de zinc
PLA:	ácido poliláctico
PLGA:	copolímero de ácido láctico y ácido glicólico
EVA:	etil vinil acetato
DMSO:	dimetilsulfóxido
G-CSF:	factor estimulante de colonias de granulocitos
MP:	micropartículas
CMC:	carboximetilcelulosa sódica
Zn <sup>2+</sup> :	iones de zinc
UI:	unidades internacionales



# **ESTRATEGIAS FARMACÉUTICAS PARA LA FORMULACIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS**

## **1. Introducción**

Las proteínas tienen un papel muy dinámico y versátil en el cuerpo. Entre otras funciones, las proteínas participan en numerosas reacciones bioquímicas, forman receptores y canales en membranas celulares, dan soporte estructural a nivel intra- y extracelular, y transportan moléculas dentro de una célula o desde un órgano a otro. Se estima que puede haber más de 40000 proteínas funcionalmente distintas [1,2]. Desde un punto de vista terapéutico, este número tan alto representa una oportunidad tremenda en términos de su aprovechamiento en el tratamiento de enfermedades. De todas formas, y a fecha de hoy, solamente unas 130 biomacromoléculas diferentes de naturaleza proteica (proteínas y péptidos) han sido aprobadas para uso clínico por diferentes Agencias Regulatorias (por ejemplo, FDA y EMEA); aunque muchas otras están en desarrollo.

La terapéutica con proteínas y péptidos ofrece un buen número de ventajas sobre la terapéutica basada en moléculas “pequeñas” (fármacos de síntesis). En primer lugar, las biomacromoléculas presentan una serie de funciones específicas y complejas que no pueden ser conseguidas por simples compuestos químicos. En segundo lugar, dado que la acción de una proteína es altamente específica, hay menor riesgo para que puedan

interferir con los procesos biológicos normales y causar efectos secundarios. Por otra parte, como el cuerpo produce de manera natural muchas de las proteínas que son utilizadas como agentes terapéuticos, estas son mejor toleradas y están menos predisuestas a producir respuestas inmunitarias. Además, en el caso de enfermedades donde un gen está mutado o inhibido, las proteínas terapéuticas pueden dar lugar a un tratamiento de reemplazo efectivo sin necesidad de tener que recurrir a estrategias terapéuticas más complejas y, en la actualidad, con importantes reservas en cuanto a su seguridad (por ejemplo, terapia génica). Otro aspecto importante es que la aprobación, por las Agencias Regulatorias, de un medicamento biológico es más rápido que para otro tipo de fármacos. Así, un estudio publicado en 2003 demostró como la media del tiempo de desarrollo clínico y aprobación de 33 medicamentos biológicos (aprobados entre 1980 y 2002) había sido 1 año inferior a la media del tiempo necesitado por 294 moléculas pequeñas aprobadas en el mismo periodo [3]. Por último, dado que las proteínas son únicas en forma y función, las Compañías Farmacéuticas pueden obtener una protección mediante patente de gran alcance y robustez.

Las proteínas terapéuticas pueden ser clasificadas en función de su acción farmacológica en cuatro grupos diferentes: proteínas y péptidos con actividad enzimática o regulatoria (Grupo I), biomacromoléculas con actividad de orientación (“targeting”) específica (Grupo II), vacunas proteicas (Grupo III) y, proteínas como agentes de diagnóstico (Grupo IV) [4,5].

En el primer grupo se incluyen aquellas biomacromoléculas utilizadas para paliar el déficit de una proteína endógena. Dentro de este Grupo I, y en función de su actividad, se pueden identificar tres subgrupos diferentes: macromoléculas para reemplazo de una proteína deficiente o producida de forma anormal (Grupo Ia; p.ej., insulina o somatotropina); macromoléculas para aumentar la cantidad de una proteína endógena (Grupo Ib; p.ej., eritropoyetina); y, macromoléculas para ofrecer una nueva función o actividad (Grupo Ic; p.ej., papaína, colagenasa o l-asparaginasa).

El Grupo II constituido por las biomacromoléculas con propiedades de targeting se puede subdividir, a su vez, en dos subgrupos. El primero (Grupo IIa) incluiría aquellos biológicos con propiedades de reconocimiento específico capaces de unirse a un determinado blanco con el fin de bloquear su función, destruirlo o constituir una señal para su recono-

cimiento. En este grupo se incluyen los anticuerpos monoclonales como etanercept, infliximab, trastuzumab o bevacizumab. El segundo subgrupo (Grupo IIb) lo constituirían aquellas macromoléculas transportadoras capaces de ofrecer una distribución específica hacia la diana terapéutica. En este grupo se incluyen, por ejemplo, gemtuzumab ozogamicin (calicheamicina unida a un anticuerpo monoclonal específico para CD33) [6]), o ibritumomab tiuxetan (Zevalin<sup>®</sup>) que contiene itrio-90 [7].

El Grupo III incluye vacunas profilácticas frente a agentes infecciosos o agentes extraños deletéreos (Grupo IIIa), vacunas para tratar enfermedades autoinmunes (Grupo IIIb) o para inmunoterapia frente a cáncer (Grupo IIIc). Finalmente el Grupo IV incluiría aquellos medicamentos destinados a la identificación y cuantificación de hormonas (glucagón, secretina, tirotropina), agentes de imagen (tecnecio fanolesomab, apcítide) o agentes de imagen específicos para el diagnóstico de cáncer (indio-111-octreotide, satumomab pendetide) [4].

En los últimos años, un número creciente de péptidos y proteínas terapéuticas han sido aprobadas para uso clínico. Así, entre 2006 y 2012, las ventas de este tipo de compuestos prácticamente se duplicaron desde unos 64.000 millones a 125.000 millones de dólares. Un indicador del extraordinario crecimiento de este tipo de medicamentos es el aumento en el número de ensayos clínicos en los últimos 5 años. Otro indicador es el número de “blockbusters” (medicamentos con ventas de más de 1000 millones de dólares por año) [8]. En 2006, había 20 blockbusters de origen biológico, mientras que en 2012 el número era ya de 33. Este tipo de medicamentos se espera que continúe incrementándose y que represente alrededor del 20% del mercado total en 2017, alcanzando unas ventas superiores a los 220.000 millones de dólares. La Tabla I resume los medicamentos basados en proteínas terapéuticas con mayores ventas en 2014.

Tabla I. Clasificación de los 10 mayores blockbusters basados en proteínas terapéuticas ordenados por ventas en 2014 [9,10].

	<b>Ventas (x109 \$)</b>	<b>Pérdida patente UE / USA</b>	<b>Indicaciones</b>
<b>Adalimumab</b> ( <i>Humira</i> <sup>®</sup> ; <i>Abbott</i> )	12,5	04-2018/ 12-2016	Artritis reumatoide, Psoriasis Enfermedad de Crohn Colitis ulcerosa
<b>Infliximab</b> ( <i>Remicade</i> <sup>®</sup> ; <i>J&amp;J, Merck</i> )	9,2	08-2014/ 09-2018	Artritis reumatoide En- fermedad de Crohn Psoriasis, Colitis ulcerosa
<b>Rituximab</b> ( <i>Rituxan</i> <sup>®</sup> , <i>MabThera</i> <sup>®</sup> ; <i>Roche/Biogen</i> )	8,7	11-2013/ 12-2018	Linfoma no Hodgkin Leucemia linfocítica aguda Artritis reumatoide
<b>Etanercept</b> ( <i>Enbrel</i> <sup>®</sup> ; <i>Amgen/Pfizer/ Takeda</i> )	8,5	02-2015/ 11-2028	Psoriasis en placas Artritis psoriasisica Artritis reumatoide
<b>Insulina glar- gina</b> ( <i>Lantus</i> <sup>®</sup> ; <i>Sanofi</i> )	7,3	expirada	Diabetes
<b>Bevacizumab</b> ( <i>Avastin</i> <sup>®</sup> ; <i>Roche</i> )	7,0	01-2022/ 07-2019	Cáncer colorectal metastásico Cáncer pulmón Glioblastoma Hígado metastásico
<b>Trastuzumab</b> ( <i>Herceptin</i> <sup>®</sup> ; <i>Roche</i> )	6,8	07-2014/ 06-2019	Cáncer de mama HER2-positivo Cáncer de estómago metastásico HER2-positivo
<b>Pegfilgrastim</b> ( <i>Neulasta</i> <sup>®</sup> ; <i>Amgen</i> )	5,9	08-2017/ 10-2015	Neutropenia causada por quimioterapia
<b>Antígenos</b> ( <i>Prevnar</i> <sup>®</sup> ; <i>Pfizer</i> )	4,5	expirada	Vacuna contra <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>Interferon β-1a</b> ( <i>Avonex</i> <sup>®</sup> ; <i>Biogen</i> )	3,0	expirada	Esclerosis múltiple

Dada la importancia creciente que presentan los medicamentos basados en proteínas y péptidos en la terapéutica actual así como las dificultades inherentes a su manipulación y formulación galénica, la presente disertación pretende abordar algunas de las estrategias empleadas en la actualidad para su formulación así como ofrecer una visión de las tecnologías y formas farmacéuticas que parecen posicionarse como las más adecuadas para un futuro cercano.

## **2. Administración parenteral**

La gran mayoría de las proteínas y péptidos terapéuticos que se encuentran comercializados hoy en día se presentan en preparaciones, sólidas o líquidas, de uso parenteral. De acuerdo con la Farmacopea Europea, las preparaciones parenterales son preparaciones estériles destinadas a ser inyectadas, administradas por perfusión, o implantadas en el cuerpo humano o animal [11]. Por ello, y aparte de los requisitos generales comunes a todo inyectable, la preparación líquida parenteral de biomacromoléculas debe ofrecer una serie adicional de requisitos: (i) permitir la disolución de la biomacromolécula en un disolvente adecuado (preferiblemente en un medio completamente acuoso), (ii) minimizar la degradación de la proteína o del péptido por hidrólisis, cambio de estructura o de conformación, o por fenómenos de agregación, y (iii) evitar la posible contaminación por microorganismos.

En el caso de preparaciones parenterales sólidas, estas deben prevenir los fenómenos de degradación de la biomacromolécula y ofrecer una fácil reconstitución en el disolvente adecuado previo a su administración.

### **2.1. Formas líquidas de administración parenteral**

Los excipientes que se incorporan a una forma líquida de administración parenteral (inyectable) deben ofrecer una función clara y justificada; evitando cualquier efecto negativo sobre la estabilidad, seguridad o eficacia del principio activo incorporado. En las concentraciones utilizadas, dichos excipientes no deben interferir en la eficacia terapéutica de la biomacromolécula o modificar los ensayos de valoración de la misma. Además, dichos excipientes deben cumplir los siguientes requisitos: elevada pureza, no contener pirógenos o contaminantes microbianos, ser atóxi-

cos y no irritantes en la cantidad administrada, permanecer inalterados y mantener su actividad durante todo el plazo de validez de la formulación y no ser incompatibles con otros componentes de la formulación [12]. Los principales tipos de excipientes para formulación de biomacromoléculas en preparados parenterales de naturaleza líquida incluyen vehículos o disolventes, tensioactivos, reguladores del pH, agentes isotonizantes y conservadores.

## **A. Vehículos o disolventes**

El vehículo más utilizado y preferido para la fabricación de preparaciones líquidas es el agua para inyectable (agua pi); aunque, en ciertas condiciones, puede ser necesario adicionar otros disolventes para aumentar la solubilidad de la molécula biológicamente activa, reducir su velocidad de degradación o para obtener un efecto prolongado.

En cualquier caso, la selección de un vehículo no acuoso no es tarea fácil. En principio los disolventes no acuosos se pueden subdividir en vehículos liposolubles, como el benzoato de bencilo o los aceites vegetales, y en vehículos hidrófilos miscibles con agua (p.ej.: etanol, glicerina, N-metil-2-pirrolidona, polietilenglicoles (PEGs), propilenglicol, Chremophor® o N,N-dimetilacetamida). Los vehículos liposolubles se pueden destinar a la obtención de preparados con efecto prolongado; mientras que los hidrosolubles son utilizados para aumentar la solubilidad de una determinada biomacromolécula o para estabilizarla frente a una eventual degradación por hidrólisis. Mención aparte merece el caso de la glicerina, que es ampliamente utilizada para prevenir la agregación y precipitación de las insulinas en solución acuosa así como para regular la tonicidad de las soluciones resultantes [13]. Igualmente, la glicerina es empleada en algunos kits de diagnóstico (como el Multitest CMI system, Pasteur Merieux) que aplica de manera simultánea siete antígenos diferentes para medir hipersensibilidad retardada en la valoración de inmunidad celular [14].

## **B. Tensioactivos**

Los tensioactivos o agentes de superficie activa aumentan la solubilidad de la biomacromolécula en un medio líquido (normalmente acuoso) mediante reducción de la tensión superficial. Como consecuencia los tensio-



activos pueden tener poder detergente, poder emulgente (capacidad para producir dispersiones coloidales de producto lipófilo en un medio acuoso), poder espumante y actividad mojante (hace que el agua impregne un compuesto o superficie de forma homogénea) [15,16]. Algunos ejemplos de tensioactivos utilizados en la formulación de formas líquidas parenterales incluyen al polisorbato 80 (Tween® 80), polisorbato 20 (Tween® 20), lecitinas, Solutol® HS-15, ciertos copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno (p.ej., Pluronic® F-64) y derivados de polietilenglicol (alfa-tocoferil polietilen glicol 1000 succinato o TPGS).

### C. Reguladores del pH

Las soluciones reguladoras se utilizan para aproximar el pH del preparado inyectable a un valor fisiológico o para aumentar la estabilidad de la biomacromolécula en las condiciones del preparado inyectable. Como reguladores del pH se utilizan soluciones diluidas de ácidos o bases inorgánicas (p.ej.: HCl o NaOH), aminoácidos (glicina, arginina, lisina) y soluciones reguladoras de fosfatos, citratos, acetatos, carbonatos, TRIS (trometamina o trometamol) o boratos. La Tabla II recoge algunos ejemplos de utilización de agentes reguladores de pH en la formulación de biomacromoléculas.

Tabla II. Reguladores de pH utilizados en medicamentos de proteínas y péptidos.

Regulador pH	Medicamento	Proteína/péptido
Acetatos	Syntocinon®	Oxitocina
Arginina	Retavase®	Reteplasa
Ácido bórico/ sodio	Comvax®	Antígenos proteicos frente <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b y hepatitis B
Carbonatos	HypeRab®	Inmunoglobulina antirrábica
Glicina	Hep-B Gammage®	Inmunoglobulina antihepatitis B
Lisina	Eminase®	Anistreplasa
Fosfatos	Saizen®	Somatropina
	Pregnyl®	Gonadotropina

## **D. Agentes isotonzantes**

Desde un punto de vista general, las formulaciones parenterales deberían ser isotónicas con el plasma con el fin de evitar daños en los tejidos; aunque, en caso de administración intradérmica, subcutánea o intramuscular no es un requisito obligatorio. Los agentes isotonzantes más comúnmente utilizados en la formulación de proteínas y péptidos son: cloruro sódico, cloruro potásico o glucosa. La glicerina, sacarosa y manitol también son utilizados en algunos casos particulares.

## **E. Conservadores: antioxidantes, antimicrobianos y quelantes**

Los antioxidantes se añaden para proteger el principio activo de la oxidación, especialmente cuando la degradación se ve favorecida por las condiciones de la esterilización. En algunos casos, también se puede proteger el preparado trabajando en atmósfera inerte y desplazando el aire, que está en contacto con la solución de la biomacromolécula durante el proceso de dosificación, mediante saturación de la preparación con nitrógeno o con argón. Los antioxidantes más comúnmente utilizados son: ácido ascórbico y derivados, sales de ácido sulfuroso (bisulfito, metabisulfito), monotioglicerol, aminoácidos (cisteína, metionina), glutamato monosódico (utilizado en Varivax<sup>®</sup>, vacuna frente a varicela) o glutatión (presente en Advate<sup>®</sup>, factor VIII antihemofílico). En algunos casos se prefiere utilizar azúcares y polioles (glicerina, manitol, glucosa, dextranos), para inhibir la oxidación de las proteínas, dado que actúan como secuestrantes de radicales libres [15,17].

Los conservantes antimicrobianos se utilizan para prevenir el crecimiento de microorganismos, principalmente en preparaciones inyectables presentadas en sistemas multidosis. La Tabla III recoge los antimicrobianos más utilizados en la formulación de soluciones inyectables así como algunos ejemplos de utilización en la formulación de biomacromoléculas.

Tabla III. Conservadores antimicrobianos utilizados en la formulación de soluciones inyectables así como algunos ejemplos de uso.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Concentración uso (%)</b>	<b>Medicamento</b>
Cloruro de benzalconio	0,02	
Cloruro de bencetonio	0,01	BioThrax <sup>®</sup> , vacuna frente ántrax
Cloruro miristil-gamma-picolinium	0,02-0,17	
Alcohol bencílico	0,75-5	
Clorobutanol	0,25-0,5	
m-Cresol	0,1-0,35	Humalog <sup>®</sup> , insulina lispro
Fenol	0,15-0,5	
2-Fenoxietanol	0,5	Havrix <sup>®</sup> , vacuna hepatitis A
Metil paraben	0,05-0,18	
Propil paraben	0,005-0,1	
Nitrato de fenilmercurio	0,001	Antivenin <sup>®</sup> , antitoxina frente a mor-disco serpiente coral
Tiomersal	0,003-0,012	Atgam <sup>®</sup> , gammaglobulina antitimocítica equina

Finalmente, los agentes quelantes son capaces de unir de forma específica iones metálicos. Fundamentalmente son utilizados para reforzar la actividad de antioxidantes y antimicrobianos. Como agentes quelantes se usan el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y sus sales (p.ej.: hialuronidasa en Wydase<sup>®</sup>) y, menos habitualmente, el ácido fosfórico y el ácido cítrico y sus sales.

## **2.2. Formas sólidas de administración parenteral**

En la formulación de estos sólidos estériles se incluyen los diferentes grupos de excipientes descritos en la sección anterior. Las formas sólidas de administración parenteral de proteínas y péptidos se obtienen, en general, por liofilización. Esta operación farmacéutica condiciona la formulación, en especial la adecuada selección de los reguladores del pH así como de crioprotectores y lioprotectores que aseguren la estabilidad de la biomacromolécula durante la liofilización y posterior almacenamiento.

### **A. Reguladores del pH**

El control del pH de la disolución de la proteína o péptido es crítica para evitar su degradación durante la preparación, almacenamiento y reconstitución del producto liofilizado. En el proceso de liofilización, el sistema regulador debería cristalizar en un estado amorfo, ofrecer una elevada temperatura de colapso (para asegurar un secado primario más rápido), no ser volátil (prevenir así la modificación del pH durante el proceso), y poseer una elevada temperatura de transición vítrea (con el fin de asegurar la estabilidad durante el almacenamiento) [18].

De forma práctica, en productos liofilizados, es desaconsejable el uso de soluciones reguladores de acetatos, debido a su naturaleza volátil [19]. Por otra parte, las sales de fosfato pueden cristalizar durante la etapa de enfriamiento y congelación de la solución, lo que conduce a una disminución del pH de la solución de aproximadamente 4 unidades [20]. Este problema de la cristalización de sales también puede ocurrir con soluciones de tartratos y succinatos [21]. En estas condiciones, las soluciones reguladoras de citratos son las preferidas para la formulación de proteínas y péptidos por liofilización. Los citratos adoptan una estructura amorfa y no hay problema de variaciones de pH durante el proceso. Otras estrategias para el ajuste de pH en soluciones de proteínas o péptidos destinadas a liofilización, puede ser el uso de aminoácidos o TRIS.

### **B. Agentes de carga, crioprotectores y lioprotectores**

Los agentes de carga forman el volumen del producto liofilizado y le aportan a la torta seca una consistencia y estructura adecuada. Estos son

absolutamente necesarios cuando se tiene que liofilizar soluciones con contenidos en sólidos inferiores al 2% [22]. Hay que tener en cuenta que la estructura de la torta seca obtenida por liofilización es importante, pues su estructura debe ser lo suficientemente porosa como para facilitar el adecuado escape del vapor de agua, durante el ciclo de secado [23].

Por otra parte, el crioprotector es aquel excipiente farmacéutico que permite proteger el ingrediente activo durante la etapa de congelación. En general, el crioprotector actúa también como agente de carga. Entre los más utilizados se encuentran ciertos sacáridos (sacarosa, lactosa, manitol, sorbitol, trehalosa), polietilenglicoles, polivinilpirrolidona, proteínas (albúmina) y aminoácidos (prolina, glicina).

Finalmente, los lioprotectores son aquellos compuestos que permiten estabilizar y prevenir la degradación del producto activo durante el proceso de secado y, posteriormente, durante el almacenamiento. Estos compuestos también pueden actuar como agentes de carga. Desde un punto de vista ideal, los lioprotectores deberían adoptar una estructura amorfa y poseer una mayor temperatura crítica [24,25]. Los lioprotectores más utilizados son la trehalosa (2%), sacarosa (5%), maltodextrinas, dextranos, almidón y la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Otra posibilidad es la utilización de manitol mezclado con glicina o sales. En esas condiciones, manitol adopta una estructura amorfa.

## **C. Otros excipientes**

En la preparación de sólidos liofilizados pueden intervenir otra serie de excipientes farmacéuticos como los isotonzantes o los conservantes. También, y de manera frecuente, se utilizan tensioactivos para minimizar los fenómenos de agregación de las proteínas durante el llenado de los viales, la congelación y la rehidratación previa a su utilización. La presencia de un tensioactivo facilita el adecuado plegamiento de las proteínas durante la rehidratación [26].

La Tabla IV recoge la composición y presentación de los 10 medicamentos basados en proteínas terapéutica con mayores ventas en 2014.

Tabla IV. Composición y presentación de los 10 mayores “blockbusters” basados en proteínas terapéuticas ordenados por ventas en 2014. SC:

subcutánea, IV: intravenosa, IM: intramuscular; JP: jeringa precargada; AU: autoinyector.

	<b>Ruta</b>	<b>Composición</b>	<b>Presentación</b>
<b>Humira®</b>	SC	<b>Adalimumab</b> , ácido cítrico, citrato sódico, sales de fosfato, NaCl, NaOH, manitol, agua pi	Solución (JP/AU)
<b>Remicade®</b>	IV	<b>Infliximab</b> , sales de fosfato, polisorbato 80, sacarosa	Polvo (Vial)
<b>Rituxan®, Mab-Thera®</b>	IV	<b>Rituximab</b> , citrato trisódico, NaCl, polisorbato 80, agua pi	Solución (Vial)
<b>Enbrel®</b>	SC	<b>Etanercept</b> , manitol, sacarosa, Tris	Polvo (Vial)
	SC	<b>Etanercept</b> , sacarosa, NaCl, arginina, sales de fosfato, agua pi	Solución (JP/AU)
<b>Lantus®</b>	SC	<b>Insulina glargina</b> , ZnCl <sub>2</sub> , m-cresol, glicerol, HCl, NaOH, polisorbato 20, agua pi	Solución (JP/AU)
<b>Avastin®</b>	IV	<b>Bevacizumab</b> , trehalosa, fosfato sódico, polisorbato 20, agua pi	Solución (Vial)
<b>Herceptin®</b>	IV	<b>Trastuzumab</b> , histidina, trehalosa, polisorbato 20. Diluyente: agua pi y alcohol bencílico	Polvo (Vial)
<b>Neulasta®</b>	SC	<b>Pegfilgrastim</b> , acetato sódico, sorbitol, polisorbato 20, agua pi	Solución (JP)
<b>Prevnar®</b>	IM	<b>Antígenos</b> , buffer succinato, sales de aluminio, polisorbato 80	Suspensión (JP)
<b>Avonex®</b>	IM	<b>Interferón β-1a</b> , ácido acético, acetato sódico, arginina, polisorbato 20, agua pi	Solución (JP/AU)

### 2.3. Fabricación y acondicionamiento de preparaciones parenterales

En la fabricación de preparaciones parenterales de proteínas y péptidos se incluyen diversas etapas; algunas de las cuales incluyen aspectos claves que condicionan de manera importante la estabilidad y, por ende, la formulación y calidad del preparado final. Desde un punto de vista general, la preparación de preparados parenterales incluye etapas de disolución

de los distintos componentes (biomacromolécula y excipientes), filtración estéril, dosificación aseptica y, si necesario, liofilización (Figura 1). En las etapas de disolución y de acondicionamiento, diferentes factores pueden condicionar la calidad del preparado: pH de la preparación, velocidad de agitación, tipo de agitador, materiales en contacto con la solución de la biomacromolécula, etc. Otra etapa crítica es la filtración esterilizante. En este caso, el proceso de filtración puede dar lugar a cambios en la estructura cuaternaria de la proteína y/o a la pérdida de una fracción importante de la misma debido a su adsorción al filtro. Aquí, de nuevo, la correcta elección del sistema filtrante y/o la utilización de tensioactivos pueden minimizar dicho problema.

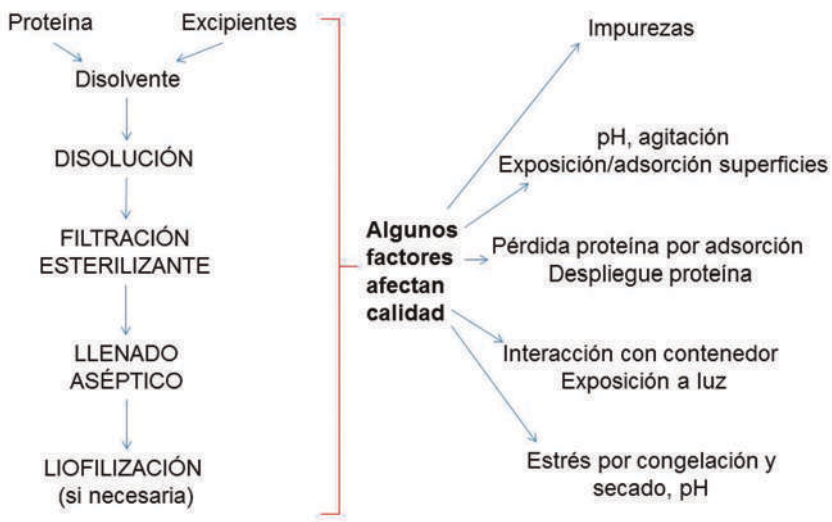
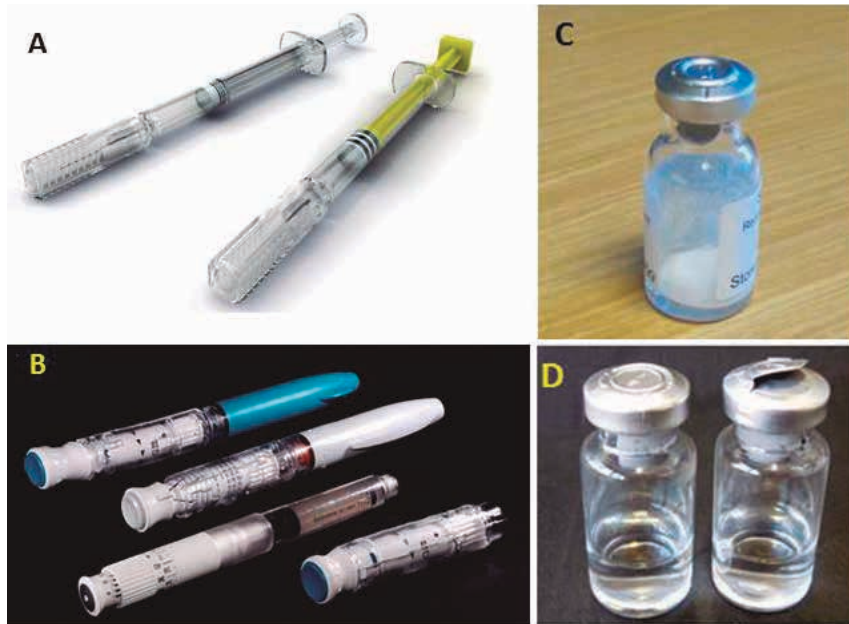


Figura 1. Algunos de los factores, relacionados con el proceso de preparación, que afectan a la calidad de formas parenterales de proteínas y péptidos.

Las preparaciones inyectables de proteínas y péptidos, generalmente de pequeño volumen, se acondicionan en jeringas “prellenadas” o “precargadas” (Figura 2A), en sistemas autoinyectables o plumas (Figura 2B) o en viales (Figuras 2C y 2D).

Las jeringas precargadas, listas para ser usadas, son preparaciones estériles que contienen una dosis prefijada de biomacromolécula (junto con los excipientes adecuados) destinada a ser inyectada en el cuerpo. Estas jeringas incluyen una aguja estéril y fueron desarrolladas para facilitar

el trabajo a los profesionales sanitarios. La evolución de las jeringas precargadas ha llevado al desarrollo de los “autoinyectores”, destinados directamente al paciente con el fin de facilitarle la administración de la medicación.



*Figura 2. Acondicionamiento primario de formas de administración parenteral para proteínas y péptidos. A: jeringas precargadas; B: autoinyectores o plumas; C y D: viales.*

## **2.4. Formas parenterales de liberación controlada**

Desde un punto de vista general, las formas parenterales convencionales, como las mostradas anteriormente, dan lugar a perfiles sanguíneos de la molécula biológicamente activa caracterizados por una concentración inicial muy elevada (en muchos casos cercana a los niveles tóxicos), que disminuye rápidamente y, como consecuencia, la duración del efecto es bastante limitado. En el caso de tratamientos crónicos o cuando la biomacromolécula presenta semividas biológicas cortas (típico de ciertos péptidos y proteínas), el paciente debe recibir frecuentemente la medicación. Con el fin de minimizar estos problemas, en los últimos años han aparecido diferentes preparaciones parenterales de liberación controlada. Estas formas farmacéuticas están diseñadas para conseguir perfiles de liberación predecibles y sostenidos en el tiempo.



Estas preparaciones parenterales pueden subdividirse en dos grupos. El primero, los sistemas implantables, incluiría aquellas formas farmacéuticas que forman un depósito en el lugar de administración. Aquí se pueden incluir los geles parenterales, los implantes y las micropartículas. El segundo grupo incluiría aquellos sistemas que, administrados por vía parenteral, son capaces de modificar la distribución del principio activo y “conducirlo” hasta su lugar de acción. Aquí se pueden incluir los sistemas submicrónicos de naturaleza lipídica, como los liposomas, o polimérica, como las nanopartículas, las micelas o los polímeros terapéuticos.

## **A. Sistemas implantables de liberación controlada**

Los sistemas implantables de liberación controlada se administran mediante inyección subcutánea, intramuscular o en algún otro lugar específico del organismo. También, en algunos casos, pueden ser introducidos mediante operación quirúrgica. Tras la administración forman un depósito o reservorio de fármaco en el lugar de administración, desde donde la biomacromolécula se va liberando de forma sostenida en el tiempo [27,28]. De forma general, estos sistemas ofrecen las siguientes ventajas:

- Liberar el principio activo a una velocidad controlada;
- Optimizar la relación dosis-respuesta-duración de la acción;
- Garantizar la ausencia de complicaciones médicas (no es necesario un seguimiento médico directo);
- Mayor aceptación del tratamiento por parte del paciente al reducir el número de administraciones, siendo ideal para tratamientos crónicos.

Obviamente estos sistemas también incluyen algunos inconvenientes, como la mayor complejidad y coste de fabricación a nivel industrial. En algunos casos, y dependiendo de la naturaleza del sistema que da lugar al implante, puede haber retrasos en el comienzo de la acción de la biomacromolécula. Por último, en el caso de sistemas no biodegradables, el recurso a la cirugía suele ser necesario para introducir y retirar el sistema implantable.

## **Implantes**

Los implantes son formas sólidas, generalmente de forma cilíndrica o laminar, y estériles, destinadas a su colocación en alguna zona concre-

ta del organismo mediante cirugía menor o utilizando algún sistema de inyección particular. Este método de administración es su principal inconveniente [29].

En general actúan como sistemas matriciales que liberan de forma continuada la proteína o el péptido durante periodos prolongados de tiempo, normalmente varios meses. En principio, estos implantes están formados por excipientes completamente biodegradables, que permiten la disolución y absorción total del material que da soporte al implante sin producir fenómenos de toxicidad ni respuestas inmunológicas en el paciente. Para ello se emplean principalmente polímeros del grupo de los poliésteres, destacando el ácido poliláctico (PLA) y los copolímeros del ácido láctico y glicólico (PLGA). También se han propuesto polímeros naturales como el alginato, el quitosano, el colágeno y la gelatina [27].

Existen también algunos implantes no biodegradables. Para ello se utilizan siliconas, etil vinil acetato (EVA) o metacrilatos. El uso de estos implantes, que normalmente ofrecen sistemas de liberación de fármacos durante periodos muy largos (más de 1 año), implica una segunda intervención para su retirada.

Los procedimientos para la fabricación de implantes se basan en técnicas de moldeo, extrusión o compresión. Las dos primeras son las más utilizadas e implican la mezcla de la biomacromolécula con el polímero, previamente disuelto en un disolvente orgánico o calentado para que tenga cierta fluidez. Posteriormente el conjunto se añade a un molde de Teflón o se le fuerza a pasar a través de un orificio en un extrusor. La Tabla V recoge implantes comercializados para la administración de péptidos. La Figura 3 muestra algunos de estos implantes.

Tabla V. Ejemplos de implantes para la administración de péptidos.

<b>Péptido</b>	<b>Medicamento</b>	<b>Características</b>
<b>Goserelina, acetato</b>	<b>Zoladex<sup>®</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implante cilíndrico de PLGA</li> <li>• Péptido es liberado en 1-3 meses</li> </ul>
<b>Buserelina, acetato</b>	<b>Profact Depot<sup>®</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implante de PLGA</li> <li>• Péptido es liberado en 2-3 meses</li> </ul>
<b>Histrelina, acetato</b>	<b>Vantas<sup>®</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Copolímero de hidroxipropil metacrilato y 2-hidroxi metacrilato</li> <li>• Implante cilíndrico</li> <li>• Péptido es liberado en 12 meses</li> </ul>
<b>Leuprolide, acetato</b>	<b>Viadur<sup>®</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implante cilíndrico de titanio (12,7 mm) con “tabletas osmóticas” (tecnología DUROS)</li> <li>• Péptido es liberado en 12 meses</li> </ul>

Recientemente, y con el fin de evitar las inconvenientes asociados a la administración de un implante sólido, se han desarrollado algunas estrategias para la formulación de implantes de formación “in situ”. Una de estas sería la tecnología Atrigel<sup>®</sup>, la cual se basa en la utilización de un polímero insoluble en fluidos biológicos (p.ej., PLGA) disuelto en un vehículo miscible con agua (p.ej., N-metil-2-pirrolidona, PEG o DMSO) que contiene la biomacromolécula en forma de solución o suspensión. Cuando esta preparación se inyecta en el cuerpo con sistemas convencionales de inyección, el vehículo difunde hacia los tejidos adyacentes mientras que el polímero precipita dando lugar a un implante sólido macroscópico de tipo reservorio [30]. Esta estrategia ha sido utilizada para formular acetato de leuprolide mediante administración subcutánea y proveer niveles terapéuticos del péptido durante periodos de tiempo de hasta 6 meses (Eligard<sup>®</sup>, Figura 3).

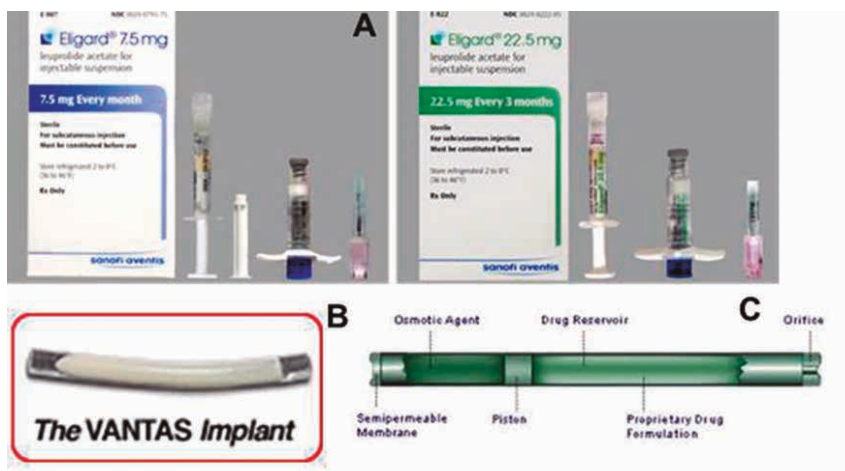


Figura 3. Formas parenterales implantables para proteínas y péptidos. A: Tecnología Atrigel (Eligard® [31]). B: Vantas®, implante [32]. C: Tecnología DUROS de Alza Corporation [33].

## Geles inyectables

Los geles inyectables son geles estériles que tienen una viscosidad adecuada para garantizar una liberación modificada del principio activo en el lugar de la inyección. Se presentan como una forma líquida administrable mediante inyección con jeringa y aguja tradicionales. Tras la administración y el contacto con los fluidos biológicos acuosos de la zona de inyección, la preparación líquida administrada gelifica dando lugar a una forma de liberación prolongada en el tiempo [28].

Estos geles de formación “in situ” se caracterizan por tener una fase de transición sol-gel dependiente de un estímulo externo, como puede ser el cambio de temperatura y/o la modificación del pH. La formulación y preparación de estos geles inyectables es muy simple y similar a los procedimientos descritos con las preparaciones parenterales líquidas. La única diferencia consistiría en la adición del agente gelificante a la concentración adecuada. Entre estos agentes gelificantes se encuentra el ácido hialurónico, los alginatos y ciertos copolímeros del óxido de etileno y óxido de propileno (Pluronic®) [34, 35]. En los últimos años se han desarrollado polímeros basados en poliésteres biodegradables y PEGs para uso biomédico. Así, la compañía MacroMed desarrolló polímeros termosensibles en estructuras tribloque de tipo ABA o BAB. En estas estructuras, “A” representa la porción poliéster hidrofóbica y “B” se corresponde con

el bloque hidrofílico de PEG. El vehículo ReGel® formado por un 23% p/p de PLGA-PEG-PLGA en solución reguladora de fosfatos [36, 37] ha sido propuesto para la administración de diferentes proteínas, tales como insulina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B [38]. Más recientemente, los organogeles también han sido identificados como una plataforma interesante para el desarrollo de preparados parenterales de proteínas y péptidos. Estos sistemas se presentan como lípidos insolubles en medios acuosos que se hinchan en agua y dan lugar a cristales líquidos liotrópicos. Están formados por lípidos anfifílicos insolubles (monooleato de glicerol, monopalmitoestearato de glicerol, monoestearato de sorbitano), modificadores de la gelificación (polisorbato 20 o polisorbato 80) y un disolvente orgánico o un aceite. En la bibliografía se pueden encontrar interesantes revisiones sobre esta temática [39, 40].

En cualquier caso, en la actualidad existen un cierto número de medicamentos basados en estos geles inyectables de formación in situ, que liberan la molécula biológicamente activa durante un periodo comprendido entre 2 y 8 semanas. Se trata, fundamentalmente, de inyectables de administración intramuscular y subcutánea que incluyen biomacromoléculas como lanreótido, triptorelina, somatropina, o bromocriptina.

## **Micropartículas**

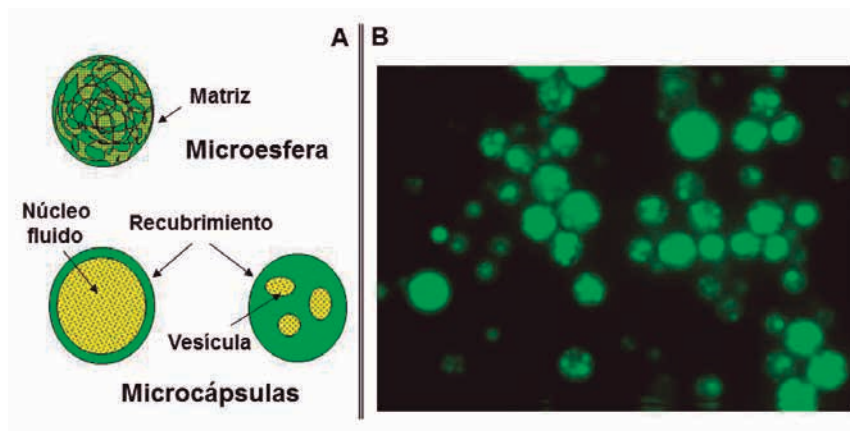
Las micropartículas se definen como partículas individuales, sólidas cuyo rango de tamaño se encuentra entre 1 y 250  $\mu\text{m}$ . El principio activo se encuentra disuelto, atrapado o encapsulado en el interior de la partícula y/o adsorbido a su superficie. Estas partículas, formadas a partir de polímeros o de macromoléculas, actúan (en general) como implantes microscópicos que liberan el principio activo durante periodos prolongados de tiempo [41]. En general se formulan en viales o jeringas precargadas en forma de polvo seco a dispersar justo antes de su administración por medios convencionales.

En función de su morfología y según las técnicas de fabricación utilizadas, es posible distinguir tres categorías de micropartículas (Figura 4):

- Microesferas: partículas plenas, constituidas por una red o matriz continua de un material soporte (el polímero) en el cual la sustan-

- cia a encapsular está, en general, dispersada al estado molecular. Estas microesferas actúan como sistemas matriciales monolíticos.
- **Microcápsulas:** Partículas constituidas por un núcleo de naturaleza fluida (líquido o semi-sólido) recubierto y confinado por un recubrimiento sólido de tipo polimérico que actúa como membrana que limita la liberación del compuesto encapsulado.
  - **Microcápsulas homogéneas o microesferas heterogéneas:** Son sistemas mixtos que poseen zonas ricas y pobres en la molécula biológicamente activa. Presentan una estructura interna que, en general, está caracterizada por poseer varias vesículas (donde se encuentra la biomacromolécula) atrapadas dentro de una red o matriz polimérica.

Todas estas micropartículas se elaboran con polímeros biodegradables, siendo los poli(ésteres), PLA y PLGA principalmente, los excipientes más empleados. Otros materiales como carbohidratos (alginato, quitosano), lípidos y proteínas (albúmina sérica humana) también pueden ser utilizados. En términos generales, es deseable que el material utilizado para preparar las micropartículas reúna las siguientes características: biodegradable, biocompatible, no inmunogénico, no tóxico (incluyendo los productos de degradación), fácilmente procesable, y capaz de proporcionar la máxima protección al material activo frente a agentes externos (pH, enzimas).



*Figura 4: Tipos de micropartículas: A) Estructura de microesferas y microcápsulas; B) Microesferas heterogéneas/ microcápsulas homogéneas con vesículas líquidas dispersadas en una matriz polimérica.*

La fabricación de las micropartículas depende de las propiedades físicas y químicas de la pareja molécula biológicamente activo/polímero así como de las características finales de las micropartículas a obtener. Desde un punto de vista general las micropartículas son preparadas principalmente por cinco técnicas diferentes [41-43]: evaporación del disolvente, coacervación, fusión en caliente, gelificación iónica y “spray-drying” (secado por atomización).

El procedimiento de la evaporación del disolvente es la técnica más simple para obtener micropartículas poliméricas. La disolución del polímero conteniendo el fármaco (en disolución o dispersión) se emulsifica con una fase externa acuosa. El disolvente de la fase interna se elimina mediante difusión hacia la fase acuosa y/o por evaporación. Posteriormente las micropartículas obtenidas se recogen y se secan. Esta técnica es apropiada para la encapsulación de sustancias liposolubles. Cuando se desea encapsular una molécula biológicamente activa de naturaleza hidrofílica se recomienda utilizar la técnica de la emulsión múltiple, en la cual una solución acuosa del fármaco se dispersa en una solución orgánica o lipófila del polímero. La emulsión resultante se dispersa a su vez en una fase acuosa externa. Posteriormente se elimina el disolvente orgánico, obteniéndose las micropartículas. Las partículas son recolectadas por filtración, centrifugación y secado [44].

La técnica de la coacervación es un procedimiento relativamente simple; aunque necesita unas condiciones de trabajo muy precisas. El principio activo en solución o micronizado se dispersa en una solución de polímero. En ese momento se induce la coacervación o “separación de fases” del polímero mediante la modificación de alguna característica fisico-química de la mezcla (modificación del pH, adición de una sal, adición de otro disolvente o polímero, etc...). Los coacervados de polímero se depositan sobre las partículas del compuesto activo formando la micropartícula. Posteriormente, si necesario, estas son tratadas con algún agente (para consolidar la pared de la micropartícula), recogerse por filtración y, finalmente, ser secadas [45].

La fusión en caliente es un método sencillo que conduce generalmente a la obtención de microsferas a partir de lípidos. Consiste en disolver o dispersar la sustancia bioactiva en el material de recubrimiento fundido. El conjunto se emulsiona en una fase dispersante por la que la sustancia bioactiva no tiene ninguna afinidad, y posteriormente se enfría. Las gotículas de lípido se solidifican dejando atrapado en su interior la biom-

cromolécula a encapsular [46].

La gelificación iónica es un procedimiento que puede utilizarse para formar micropartículas a partir de polímeros que formen geles en condiciones particulares de hidratación. El caso más conocido de encapsulación por gelificación es el que tiene lugar con el alginato sódico en presencia de iones calcio. El método consiste en hacer gotear una disolución de alginato, que contiene la molécula biológicamente activa a encapsular, sobre una disolución que contiene una sal cálcica. La gelificación ocurre inicialmente en la superficie de las gotas, dando lugar a la obtención de microcápsulas flexibles y poco resistentes, en cuyo interior se encuentra el alginato disuelto y la molécula biológicamente activa. Si estas microcápsulas se mantienen en contacto con la sal cálcica durante un tiempo prolongado, los iones calcio penetran a través de la membrana externa y reticulan el alginato presente en el interior de la microcápsula dando lugar a la obtención de microesferas compactas [41,42].

Por último, en el método de secado por atomización, la solución del polímero donde la biomacromolécula está disuelta o dispersada, se pulveriza a través de un sistema atomizador dentro de una cámara cerrada atravesada por un gas caliente. En estas condiciones el disolvente del polímero se evapora obteniéndose las micropartículas [47].

Un problema asociado a la preparación de las micropartículas es la posible desnaturalización de la proteína terapéutica durante el proceso de fabricación, debido a presencia de disolventes orgánicos o a efectos de la temperatura. Por ello, un aspecto clave de la formulación es la estabilización de las proteínas y péptidos durante el proceso de fabricación. Para este propósito existen varias soluciones. Una estrategia es la adición de excipientes protectores, tales como PEGs, sacáridos y ciclodextrinas [48,49]. Así, en el caso de alfa-quimotripsina, la adición de PEG (5 kDa) y maltosa a la solución acuosa de proteína minimiza de manera significativa su agregación e inactivación [50]. Otra estrategia puede ser la utilización de la metodología denominada ProLease® (Alkermes) [46]. En este caso, la proteína es primeramente disuelta en un medio acuoso y estabilizada con iones de zinc ( $Zn^{2+}$ ). El complejo es micronizado y liofilizado para obtener partículas proteicas de 1–6  $\mu m$ . Posteriormente, las partículas se añaden a la solución de polímero (disuelto en un disolvente orgánico) conteniendo  $Zn^{2+}$ . Las microesferas se forman mediante la creación de gotas a través de una boquilla ultrasónica e inmediatamente congeladas. El disolvente orgánico se extrae por adición de etanol



o mediante una mezcla de etanol y hexano o pentano. Finalmente, las micropartículas son liofilizadas [51].

Un aspecto importante, relacionado con la formulación y acondicionamiento de las micropartículas, es la incorporación de un viscosizante (p.ej., carboximetilcelulosa sódica, CMC). Este excipiente se emplea para incrementar la viscosidad del preparado y, de esta manera, facilitar la retención de las micropartículas en el lugar de inyección.

En todos los casos estas micropartículas deben prepararse en condiciones asépticas (salas grado A con entorno grado B) a partir de materias primas estériles. En algunos casos, las micropartículas en su envase definitivo son sometidas a esterilización terminal por radiaciones ionizantes.

La Tabla VI recoge algunos de las micropartículas comercializadas junto con sus características.

## **B. Sistemas direccionados**

A pesar del creciente número de formas parenterales disponibles, existen numerosas biomacromoléculas que no pueden administrarse por una distribución inadecuada e inespecífica en el organismo que limita su eficacia terapéutica y/o aumenta su toxicidad. La aplicación de la nanotecnología puede ser una estrategia adecuada para solventar algunas de estas limitaciones. En realidad la asociación de moléculas biológicamente activas en nanosistemas farmacéuticos ha mostrado una importante eficacia a la hora de prolongar el tiempo de circulación in vivo de ciertas proteínas terapéuticas. Igualmente prometedor se ha revelado la estrategia de uso de nanotransportadores para conducir la molécula biológicamente activa a su órgano/célula diana. Desde un punto de vista ideal, los sistemas direccionados deben ser capaces de ofrecer dos características particulares [52]:

- conducir la molécula biológicamente activa a su lugar de acción o absorción, minimizando su degradación prematura y/o distribución hacia tejidos sanos;
- controlar la salida del fármaco, para que solamente sea liberado en el lugar de acción o de absorción.

Tabla VI. Ejemplos de micropartículas comercializadas. MP: micropartículas; PLGA: copolímero de ácido láctico y ácido glicólico; CMC: carboximetilcelulosa sódica; PLA: ácido poliláctico; CMC: carboximetilcelulosa sódica.

	<b>Medicamento</b>	<b>Características</b>	<b>Composición</b>
Buserelina, acetato	Suprecur <sup>®</sup> MP	MP-PLGA IM; Liberación: 1 mes	-
Exenatida	Bydureon <sup>®</sup>	MP-PLGA SC Liberación: 1 semana	Polvo: Sacarosa Disolvente: CMC, NaCl, polisorbato 20, sales fosfato, agua pi
Lanreotido, acetato	Somatuline <sup>®</sup> LA	MP-PLGA; MP-PLA IM; Liberación: 0,5 mes	Manitol, CMC sódica, polisorbato 80
Leuprolide, acetato	Lutrate <sup>®</sup> Depot	MP-PLGA IM; Liberación: 1 mes	Polvo: polisorbato 80, manitol, CMC, trietilcitrate Vehículo: manitol, NaOH, HCl, agua pi
	Lupron <sup>®</sup> Depot	MP-PLGA; MP-PLA IM; Liberación: 1-6 meses; 7,5 mg/mes	CMC, manitol, gelatina, ácido acético glacial, polisorbato 80
Octreotido, acetato	Sandostatin <sup>®</sup> LAR	MP-PLGA IM; Liberación: 1 mes	Polvo: Manitol Vehículo: CMC, manitol, Poloxamer 188, agua pi
Somatropina	Nutropin <sup>®</sup> Depot	Partículas micronizadas de fármaco embebidas en MP-PLGA IM; Liberación: 1 mes	Liofilizado: Zn acetato, Zn carbonato Vehículo: CMC, polisorbato 20, NaCl, agua pi
Triptorelina, acetato	Decapeptyl <sup>®</sup>	MP-PLGA IM; Liberación: 1 mes	Liofilizado: manitol, CMC, polisorbato 80 Vehículo: manitol, agua pi
	Decapeptyl <sup>®</sup> SR	MP-PLGA, MP-PLA IM; Liberación: 1-6 meses	Manitol, CMC, polisorbato 80 Vehículo: agua pi

Triptorelina, pamoato	Trelstar <sup>®</sup> Depot	MP-PLGA IM; Liberación: 1 mes	Manitol, CMC, polisorbato 80
	Trelstar <sup>®</sup> LA	MP-PLGA IM; Liberación:3 meses	

Los sistemas direccionados se obtienen a partir de materiales que deben ser seguros, biodegradables y/o eliminables por los procesos fisiológicos normales. Como en el caso de los implantes y las micropartículas, se utilizan principalmente polímeros sintéticos (PEG, poliésteres como PLGA, etc.), macromoléculas naturales (albúmina sérica humana) o lípidos (fosfolípidos). En función de su estructura se diferencian, entre otros, los siguientes tipos de sistemas direccionados: conjugados de proteína-polímero o conjugados poliméricos, liposomas y nanopartículas.

### Conjugados poliméricos

En los conjugados poliméricos, la biomacromolécula se une covalentemente a través de un puente degradable (en condiciones biológicas) a un polímero de naturaleza hidrofílica (Figura 5A). Adicionalmente, y en los conjugados de última generación (todavía en investigación), se incluye un compuesto o ligando adicional con el fin de mejorar las propiedades de direccionamiento o “targeting” [53]. En general, el polímero hidrofílico suele ser de la familia de los polietilenglicoles y con una masa molecular superior a 10 kDa. La unión covalente de PEG a la proteína (denominada pegilación) aumenta el tamaño hidrodinámico de la biomacromolécula, lo que prolonga su tiempo de circulación al disminuir su aclaramiento renal. Adicionalmente, la pegilación protege a la proteína de su rápida degradación y disminuye el riesgo de respuesta inmune por parte del organismo. Esto último parece producirse porque la pegilación reduce la proteólisis de la biomacromolécula así como su presentación antigénica a las células presentadoras de antígeno, sin lo cual no se puede desencadenar la respuesta inmunológica [54,55].

En la actualidad hay varios medicamentos parenterales basados en esta estrategia (Tabla 7), destacando por su utilización los conjugados de PEG con interferón alfa (Pegasys<sup>®</sup>, PegINTRON<sup>®</sup>). Así, la unión de la citoquina al bis-monometoxi-polietilenglicol de peso molecular 40000 da lugar a un conjugado con un aclaramiento 100 veces menor al de la pro-

teína libre. Ese interferón pegilado proporciona niveles persistentes y mantenidos de la citoquina en sangre durante una semana, mientras el interferón nativo debe ser administrado tres veces por semana por vía subcutánea y sus niveles presentan los típicos picos plasmáticos, siendo elevados durante las primeras 12 horas con una brusca caída posterior. Como consecuencia, la respuesta virológica obtenida con el interferón pegilado duplica la observada con los interferones estándar [54,55].

Tabla 7. Ejemplos de conjugados poliméricos (polímero-proteína) comercializados. PEG: polietilenglicol. G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos

	<b>Biomacromolécula</b>	<b>Formulación</b>	<b>Indicación</b>
<b>Oncaspar®</b>	L-asparaginasa (conjugado con PEG)	Fosfato sódico, NaCl, agua pi	Leucemia aguda linfoblástica
<b>Pegasys®</b>	Interferón alfa-2a (conjugado con PEG)	NaCl, alcohol bencílico, acetato sódico, ácido acético, polisorbato 80, agua pi	Hepatitis B/C, Melanoma
<b>PegIntron®</b>	Interferón alfa-2b (conjugado con PEG)	NaCl, alcohol bencílico, acetato sódico, ácido acético, polisorbato 80, agua pi	Hepatitis C, Melanoma
<b>Neulasta®</b>	G-CSF (conjugado con PEG)	Acetato sódico, sorbitol, polisorbato 20, agua pi	Neutropenia asociada a quimioterapia
<b>Copaxone®</b>	Glatiramer, acetato (conjugado con copolímero de L-Glu, L-Ala, L-Lys, L-Tyr)	Manitol, agua pi	Esclerosis múltiple
<b>Cimzia®</b>	Certolizumab pegol (conjugado con PEG)	Acetato sódico, NaCl, agua pi	Enfermedad de Crohn, artritis reumatoide

<b>Mircera®</b>	Epoetina beta (conjugado con PEG)	Fosfato sódico, sulfato sódico, manitol, metionina, poloxamer 188, agua pi	Anemia sintomática
<b>Somavert®</b>	PEgvisomant (conjugado con PEG)	Sales de fosfato, glicina, manitol	Acromegalia

## Liposomas y nanopartículas poliméricas

Los conjugados poliméricos tienen dos grandes limitaciones. La primera está relacionada con la relativamente baja capacidad de carga que presentan estos sistemas: el número de moléculas proteicas que pueden unirse por unidad de polímero es bajo. Por otra parte, la unión covalente de la biomacromolécula al polímero puede modificar su conformación y, como consecuencia, afectar negativamente a su actividad y eficacia.

Estos inconvenientes pueden ser solucionados mediante la incorporación, por atrapamiento o adsorción reversible, en liposomas (Figura 5B) o en nanopartículas poliméricas (Figura 5C). En principio, todos estos nanotransportadores presentan una importante capacidad de carga de biomacromolécula, sin afectar a su eficacia terapéutica.

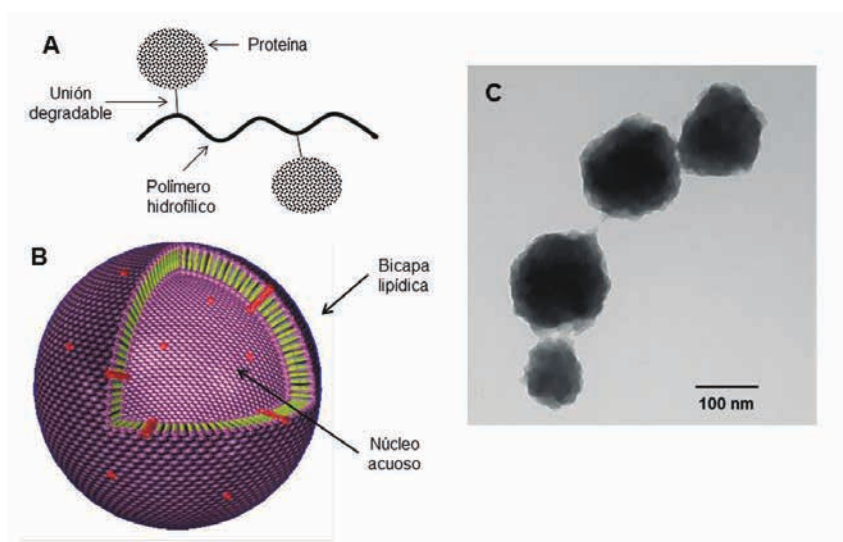


Figura 5. Representación de la estructura de conjugados poliméricos (A), liposomas (B) y nanoesferas poliméricas biodegradables (C).

Los liposomas y las nanopartículas poliméricas (así como otras nanomedicinas) pueden ser utilizados tanto para la formación de un depósito en el lugar de administración como para administración intravenosa. En el primer caso, sus propiedades y características son muy similares a las presentadas para las micropartículas. Sin embargo, su menor tamaño y su mayor capacidad para presentar la molécula biológicamente activa al sistema inmunitario les otorga un gran potencial como adyuvantes de vacunación [56]. Por vía intravenosa, tanto liposomas como nanopartículas presentan un elevado tropismo por las células fagocíticas, localizadas principalmente en hígado (células de Kupffer) y bazo, especializadas en la captura de material extraño al organismo. Este fenómeno es de interés para el tratamiento de ciertas infecciones intracelulares; aunque, su rápida captura por las células del sistema monocito-macrofágico es precisamente el factor limitante de su posible aplicación en otras patologías. Para minimizar este fenómeno fisiológico, se recurre al recubrimiento de liposomas y nanopartículas con polímeros hidrofílicos como, por ejemplo, PEGs o dextranos [57]. Ese recubrimiento hidrofílico impide la adsorción de opsoninas y otras proteínas plasmáticas que facilitan el reconocimiento de “material extraño” por parte de los macrófagos y otras células fagocíticas.

## **Liposomas**

Los liposomas son estructuras vesiculares altamente organizadas constituidas por lamelas o bicapas lipídicas (en general a base de fosfolípidos) concéntricas que encierran un núcleo acuoso. Estas vesículas lipídicas están formadas por fosfolípidos de origen natural o sintético y presentan un tamaño comprendido entre los 20 nm y varios cientos de micrómetros. Dependiendo el método de preparación, los liposomas se pueden clasificar en pequeñas vesículas unilamelares (liposomas SUV en terminología inglesa; 25-50 nm), vesículas unilamelares grandes (LUV; 100-200 nm), vesículas unilamelares gigantes (1-2  $\mu\text{m}$ ) y vesículas multilamelares (MLV, 1-2  $\mu\text{m}$ ) [58,59]. Todas estas vesículas, y principalmente debido a su composición, son altamente biocompatibles. Como las nanopartículas poliméricas, los liposomas ofrecen ventajas en cuanto a la protección de la proteína terapéutica de una rápida degradación en condiciones biológicas; prolongando su vida media y ofreciendo un tiempo de circulación sistémica más largo y una mayor biodisponibilidad. Además, como en el caso de las nanopartículas, los liposomas se pueden “decorar”

en superficie con el fin de obtener propiedades particulares que modifiquen su biodistribución y eficacia [59]. La encapsulación de proteínas terapéuticas en liposomas ha demostrado una buena eficacia terapéutica. En la literatura se pueden encontrar excelentes revisiones que dan una visión completa del estado del arte en esta cuestión [60,61].

Recientemente se ha desarrollado una tecnología, denominada Depo-Foam®, que permite producir liposomas multivesiculares [62,63]. Estos sistemas están formados por múltiples cámaras acuosas no concéntricas rodeadas por una estructura tridimensional de lípidos. Esta disposición permite aumentar la carga de molécula biológicamente activa, incrementar su estabilidad y dar lugar a perfiles de liberación más prolongados en el tiempo. Estos liposomas han dado lugar a interesantes resultados con diferentes biomacromoléculas tales como insulina, leuprolide, progeniopoietina, interferón y octreotido [62,63].

## **Nanopartículas poliméricas**

Las nanopartículas poliméricas son sistemas submicrónicos (tamaño inferior a 1 micrómetro) que se preparan a partir de polímeros naturales o sintéticos. Entre los primeros se encuentran ciertas proteínas (albúmina sérica humana) y polisacáridos (quitosano, alginato). Entre los segundos, al igual que para las micropartículas, los más utilizados son los PLA y PLGA. De acuerdo con su estructura, las nanopartículas se subdividen en nanoesferas y nanocápsulas. Las nanoesferas son de tipo matricial y, en este caso, los fármacos pueden ser absorbidos en la superficie de la esfera o encapsulados dentro de la partícula. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que el principio activo es vehiculizada en la cavidad interior; el sistema consiste en un núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica [52]. De forma similar a las micropartículas, pero con un tamaño sensiblemente menor, las nanopartículas protegen a las biomacromoléculas de su degradación prematura, prolongando su vida media en condiciones biológicas y permitiendo perfiles de liberación prolongados en el tiempo. En la literatura se encuentran diferentes artículos de revisión que resumen de manera adecuada y fiable los desarrollos, a nivel de laboratorio, que se han realizado con estas formas farmacéuticas como vehículos de péptidos y proteínas.

A pesar del gran potencial que ofrecen tanto las nanopartículas como los

liposomas, y hasta donde llega nuestro conocimiento, ningún preparado parenteral -conteniendo proteínas o péptidos- basado en estos nanotransportadores ha llegado todavía a mercado. Todavía existen obstáculos importantes asociados a una estabilidad física limitada de las dispersiones coloidales así como dificultades a la hora del escalado y producción industrial [58,64]. En cualquier caso, la versatilidad de estas formas farmacéuticas debería permitir su popularización en los próximos años. Obviamente su utilización seguirá restringida a aquellas biomacromoléculas que presenten problemas en cuando a su estabilidad, eficacia y/o toxicidad. Además es factible pensar que otros sistemas direccionados así como ciertas estrategias de “pilotaje” de dichas formas, y que actualmente están desarrollándose en los laboratorios, darán el salto al paciente. Particularmente interesante parece la estrategia de asociar los sistemas direccionados actuales a ligandos capaces de reconocer específicamente determinados receptores celulares. Entre estos ligandos se contaría con ciertos derivados de vitaminas, tensioactivos (polisorbatos), anticuerpos monoclonales, estructuras polisacáridicas o proteínas de bacterias y virus [56,64,65].

### **3. Administración a través de mucosas**

La administración a través de mucosas (pulmonar, nasal, ocular, oral) de proteínas y péptidos es una alternativa atractiva a la administración parenteral. Esta opción es la preferida por la población en general y, en muchos casos, facilita la implementación de tratamientos crónicos sin necesidad de inyecciones periódicas; aumentando la calidad de vida de los pacientes. Por otra parte, en el caso de las vacunas facilita su logística y minimiza la reutilización de jeringas y agujas que, en ciertos países, representa un problema importante de salud pública. Sin embargo, el uso de estas vías de administración se enfrenta a dificultades y complejidades importantes.

#### **3.1. Administración pulmonar**

El pulmón se caracteriza por ofrecer una amplia superficie alveolar para la absorción de moléculas biológicamente activas (75-100 m<sup>2</sup>), aparte de una buena vascularización y de una importante capacidad para el intercambio de solutos a través del fino epitelio alveolar (0,1-0,5  $\mu$ m espesor)



[66]. Sin embargo, la administración pulmonar de biomacromoléculas se enfrenta a un número importante de barreras físicas y fisiológicas así como a la ausencia de sistemas de administración adecuados para alcanzar de manera efectiva la zona alveolar y permitir, de esta manera, la absorción sistémica del agente bioterapéutico tras su inhalación [67,68]. En realidad, para alcanzar de manera efectiva la región alveolar, el diámetro medio aerodinámico de las partículas o gotículas inhaladas debe ser inferior a  $5\ \mu\text{m}$ ; preferiblemente no superior a  $3\ \mu\text{m}$ . Las partículas con tamaños superiores a  $6\ \mu\text{m}$  alcanzan los bronquios y bronquiolos mientras que las pequeñas (inferiores a  $1\ \mu\text{m}$ ) son exhaladas durante la respiración normal. Por todo ello, en el caso de la administración pulmonar, son necesarios dispositivos mecánicos capaces de generar un aerosol con un control estricto del tamaño de dichas partículas o gotículas que garantice la adecuada reproducibilidad de su interacción, deposición y retención en la región alveolar [68,69]; todo ello, idealmente, con independencia del flujo inhalatorio del paciente. Además, el número de excipientes que es posible utilizar por esta vía es sensiblemente reducido [70].

En administración pulmonar, el ejemplo pionero y característico de esta vía es el “caso Exubera”. Exubera® se diseñó como un medicamento de insulina en polvo dosificada en pequeños blisters para ser inhalado a través de un dispositivo no presurizado [71]. El hecho de dosificar insulina en polvo (1 ó 3 mg por unidad de dosificación) se debió a la necesidad de aumentar la estabilidad de la proteína. Aparte de la biomacromolécula los blisters incluían también citrato sódico (27,1%), manitol (10%), glicina (2,3%) e hidróxido sódico (0,3%).

Para la preparación, tanto la insulina como los excipientes (salvo el hidróxido sódico) se disolvían en agua pi, para posteriormente ajustar el pH a 7,3 con NaOH. La solución resultante era enfriada y filtrada a través de filtros de tamaño de poro de  $0,45$  y  $0,22\ \mu\text{m}$ . Posteriormente, la solución se secaba en un secador por atomización (Spray-drier). Con este procedimiento las partículas resultantes (conteniendo un 60% de insulina) presentaban un tamaño medio de  $1,5\ \mu\text{m}$  ( $D_{10} = 0,7\ \mu\text{m}$ ;  $D_{90} = 2,7\ \mu\text{m}$ ). Finalmente el polvo obtenido se dosificaba en blisters (Figura 6A), los cuales debían ser insertados en el inhalador (Figura 6B). De acuerdo con las características del dispositivo, cada actuación produce 200 mL de un aerosol homogéneo que permite que el 40% de la dosis se deposite a nivel alveolar (en el caso de los blisters con 1 mg de insulina) [71,72].

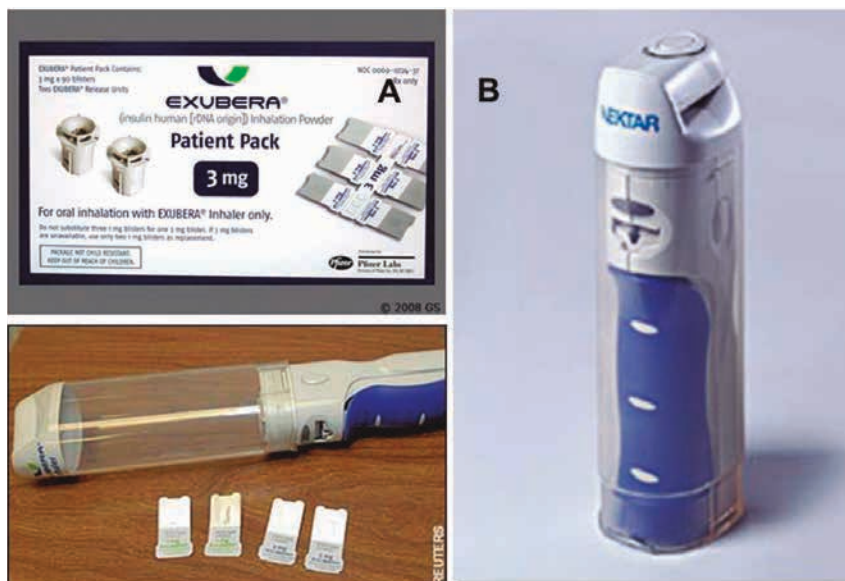


Figura 6. Exubera®. Medicamento para la administración pulmonar de insulina. A: Blisters conteniendo preparación en forma de polvo con insulina. B: Inhalador.

Exubera® fue introducido en el mercado en 2006, pero fue retirado en octubre de 2007, debido a razones económicas. En realidad, el desarrollo de este medicamento tuvo un proceso más largo y costoso del previsto inicialmente. Durante este tiempo, aparecieron agujas más finas, sistemas autoinyectores así como análogos de insulina de acción rápida que mejoraron de forma significativa los tratamientos tradicionales. Por otra parte, el dispositivo inhalador (Figura 6B) era muy grande para ser usado de forma discreta. Otro aspecto importante fue el de las unidades; en realidad, tanto médicos como pacientes están acostumbrados a cuantificar las dosis en unidades internacionales (UI), y el hecho de usar Exubera® obligaba a “traducir” la dosis empleada a “mg” de insulina. Además no era posible realizar un ajuste fino al disponer únicamente de dos presentaciones (1 y 3 mg de insulina) con el añadido de que el blíster de 3 mg no era equivalente a 3 blisters de 1 mg. Desde el punto de vista médico, también se expresaron temores en cuanto a la seguridad en el uso a largo término. Por último, la dosis de Exubera® tenía un coste de aproximadamente 5\$ mientras que la insulina convencional en inyección subcutánea presentaba, en aquel momento, un coste de 3\$ por dosis. Todo ello llevó a que las ventas no alcanzaran los niveles esperados y se decidiera su retirada del mercado.

En paralelo, otras compañías también realizaron desarrollos para administrar insulina y otras biomacromoléculas por vía pulmonar. Las mayores diferencias con Exubera<sup>®</sup> radicaban en el sistema inhalador desarrollado para la administración pulmonar de polvos o soluciones de estas biomacromoléculas [73,74]. En la Figura 7 se presentan algunos de los inhaladores desarrollados para la administración pulmonar de biomacromoléculas. En este contexto, es interesante resaltar que muy recientemente se ha aprobado, por parte de la FDA, Afrezza<sup>®</sup> (MannKind). Este nuevo medicamento, destinado a pacientes con diabetes tipo 2, contiene insulina para ser inhalada antes de las comidas mediante el dispositivo mostrado en la Figura 7D.

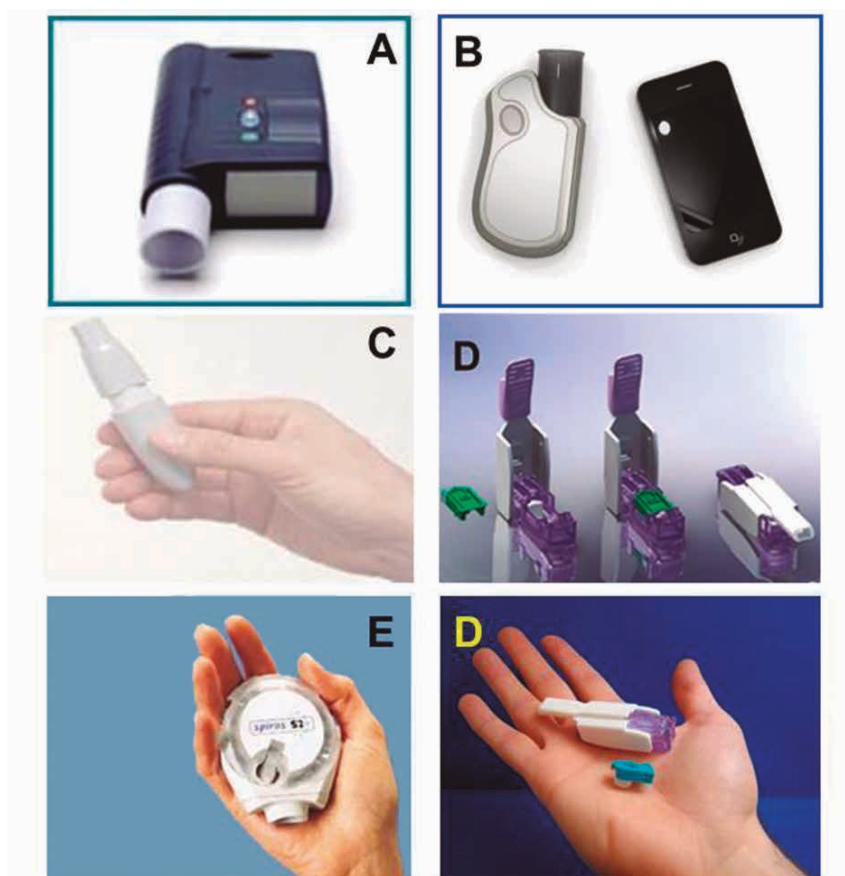


Figura 7. Inhaladores propuestos para la administración sistémica de biomacromoléculas a través de la vía pulmonar. A: Sistema electromecánico AERx (Aradigm/Novo Nordisk). B: Sistema electromecánico con tamaño similar a un teléfono móvil desarrollado por Aradigm/Novo Nordisk. C: AIR (Alkermes/Lilly). D: Technosphere Insulin (MannKind). E: Spiros (Dura Pharmaceuticals).

### 3.2. Administración nasal

La vía nasal ofrece varias ventajas, en cuanto a la administración de péptidos y proteínas, debido a su accesibilidad, elevada irrigación y a la ausencia de efecto de primer paso hepático. Sin embargo, esta mucosa no es muy permeable al paso de macromoléculas a su través; lo que hace necesario la utilización de promotores de la absorción [75].

La zona nasal contiene tres áreas funcionales denominadas vestibular, respiratoria y olfatoria [76,77]. El área respiratoria, caracterizada por una rica vascularización y una superficie relativamente grande, es donde las moléculas biológicamente activas se absorben con mayor facilidad. La retención de soluciones y o polvos aplicados en esta área está sujeta a varios factores como son el tamaño de partícula, su forma, higroscopicidad así como la presencia o ausencia de condiciones patológicas. Mientras partículas mayores de 10  $\mu\text{m}$  pueden acumularse en el área respiratoria, aquellas menores de 5  $\mu\text{m}$  son inhaladas alcanzando los pulmones, mientras que las menores de 0,5  $\mu\text{m}$  son eliminadas en el aire exhalado [78]. Por otra parte, la mucosa nasal está recubierta de una capa de moco de 5  $\mu\text{m}$  de espesor medio, con estructura de gel viscoso y que tiene un tiempo de renovación media de 10 minutos [79,80]. El moco (y todos los componentes atrapados en el) es empujada, por los cilios de las células epiteliales, hacia la nasofaringe en lo que se denomina “eliminación o aclaramiento mucociliar” [76]. Dicho mecanismo es responsable de que los compuestos aplicados nasalmente tengan un tiempo media de residencia de aproximadamente 21 minutos [75,81].

El número de macromoléculas que son aplicadas por vía nasal no es muy elevada pero, dicho grupo de compuestos se caracteriza por presentar una masa molecular entre 1 y 3,4 kDa; presentando una biodisponibilidad cercana al 10% [82]. La Tabla 8 muestra algunos de los medicamentos comercializados para la administración nasal de biomacromoléculas. Todos estos medicamentos se presentan como soluciones para administrar como gotas o mediante pulverización nasal. Un aspecto interesante que es necesario resaltar es, en la mayoría de las presentaciones disponibles, la presencia de cloruro de benzalconio. En la formulación, la función principal de este conservador antimicrobiano y tensioactivo catiónico es la de actuar como promotor de la absorción para favorecer el paso de la biomacromolécula a la circulación general.

Otra proteína que fue administrada por vía nasal hasta 2013 fue la calci-

tonina. Esta proteína se presentaba en forma de solución para pulverización nasal; incluyendo como excipientes agua purificada, cloruro sódico, HCl para ajustar el pH y cloruro de benzalconio. A pesar de su éxito y aceptación, todas las presentaciones de esta proteína administradas por vía nasal fueron retiradas del mercado tras una revisión del balance beneficio-riesgo de los tratamientos prolongados de esta proteína (incluidos aquellos asociados a la vía nasal), donde se observó un ligero incremento del riesgo de tumores.

Tabla 8. Ejemplos de medicamentos de biomacromoléculas administrados por vía nasal.

<b>Biomacromolécula</b>	<b>Denominación</b>	<b>Presentación</b>	<b>Composición</b>
Desmopresina, acetato	Minirin® 0,1 mg/mL (Sanofi-Aventis)	Solución	NaCl, HCl, clorobutanol, agua purificada
	Minirin® Spray (Sanofi-Aventis)	Pulverizador nasal	Ácido cítrico, fosfato disódico, NaCl, cloruro de benzalconio, agua pi
	OCTIM® Nasal Spray (Ferring Pharmaceuticals)	Pulverizador nasal	Ácido cítrico, fosfato disódico, NaCl, cloruro de benzalconio, agua purificada
Buserelina, acetato	Suprefact® (Sanofi-Aventis)	Solución	Ácido cítrico, citrato sódico, NaCl, cloruro de benzalconio, agua pi
Nafarelina, acetato	Synarel® (Pfizer)	Pulverizador nasal	Ácido acético glacial, NaOH/HCl, sorbitol, cloruro de benzalconio, agua purificada

En los últimos años han aparecido diferentes plataformas y estrategias para la administración nasal de proteínas y péptidos. Una de estas estrategias consiste en la utilización de nuevos promotores de absorción no irritantes para la mucosa nasal. Un ejemplo lo constituye la tecnología Intravail® (Aegis Therapeutics [83]) que ha desarrollado moléculas parecidas a ciertos tensioactivos utilizados en cuidado personal y alimentación y que son reconocidos como sustancias GRAS para diferentes apli-

caciones. En principio dichos productos serían efectivos para aumentar la absorción de biomacromoléculas hasta 30 kDa [84].

Otra estrategia consiste en la utilización de sistemas coloidales para aumentar el tiempo de residencia de las macromoléculas en estrecho contacto con la superficie de absorción de la mucosa nasal. Un caso particular sería el de la tecnología Pheroid™, basada en la utilización de formulaciones de tipo emulsión submicrónica y formada por una dispersión fina de una fase lipídica (constituida mayoritariamente por ácidos grasos esenciales) que puede adoptar la forma de vesículas o de microesponjas. Este tipo de formulación tiene la habilidad de atrapar y transportar compuestos farmacológicamente activos hasta la superficie del epitelio nasal [85,86]. Igualmente novedoso sería la plataforma ChiSys (West Pharmaceutical; [87]), basada en el uso de nanopartículas de quitosano. El quitosano es un biopolímero catiónico con propiedades mucoadhesivas, capaz de modular la apertura de las uniones estrechas existentes entre las células epiteliales y con propiedades inmunoestimulantes. En este caso estos sistemas están destinados a la administración nasal de antígenos y otras biomacromoléculas [88]. Otros sistemas de tipo micropartícula o nanopartícula polimérica también han sido propuestos; aunque ninguno de ellos ha llegado todavía a mercado. En la literatura se pueden encontrar excelentes revisiones del estado del arte con estas nuevas formas farmacéuticas [89,90].

### **3.3. Administración bucal**

Las mucosas que se encuentran en la boca están compuestas por una capa externa de epitelio escamoso estratificado que descansa sobre una membrana basal, la lámina propia y, finalmente, la submucosa como capa más interna. El epitelio está formado por capas de células apiladas unas encima de las otras; siendo el espesor total variable dependiendo de su localización. Así, el espesor de la mucosa de la zona de la mejilla sería de unos 500-800  $\mu\text{m}$ , mientras que la mucosa del paladar, el suelo de la boca y la mucosa de las encías tiene un espesor de 100-200  $\mu\text{m}$ . Por otra parte la composición del epitelio tampoco es homogénea. Así las mucosas de áreas sometidas a estrés mecánico (encías y paladar) están queratinizadas y, por tanto, son mucho menos permeables a la absorción de macromoléculas [91,92].

En la actualidad, el número de medicamentos de proteínas o péptidos desarrollados para su administración bucal es muy limitado. Sin embargo, recientemente, se ha puesto en el mercado una formulación líquida de insulina para ser administrada a través de un contenedor presurizado que genera un aerosol que se deposita en la boca del paciente. Este medicamento (Oral-lyn<sup>®</sup>) está basado en el sistema RapidMist (desarrollado por Generex Biotechnology [93]) que incluye, aparte de la proteína, un propulsor licuado (no CFC), un estabilizador de la dispersión y un promotor de la absorción. El contenedor, con un volumen de 28 mL, contiene 400 UI de insulina humana y cada actuación de la válvula libera 10 UI de insulina (que con una tasa de absorción del 10%) produce un efecto comparable a la inyección subcutánea de 1 UI [94].

### **3.4. Administración oral**

La administración de péptidos y proteínas a través de la vía oral sigue siendo una alternativa atractiva, a pesar de las grandes dificultades inherentes a la absorción de estas macromoléculas a través del tracto gastrointestinal. En general, la biodisponibilidad oral de estos compuestos es muy baja (inferior al 1%) debido tanto a sus características físico-químicas (solubilidad, pKa, estabilidad, presencia de grupos ionizables, tamaño molecular, etc.) como a ciertas características fisiológicas (condiciones de pH, vaciado gástrico, tiempo de tránsito, presencia de enzimas y bombas de extrusión, capa de moco etc.) [56,95]. Todo ello lleva a que la formulación de péptidos y proteínas para su absorción gastrointestinal siga siendo un desafío muy importante. En cualquier caso, en las últimas décadas se han realizado multitud de esfuerzos para intentar ofrecer soluciones a la baja biodisponibilidad de estos compuestos. Desde un punto de vista general, tres aproximaciones prácticas parecen ser las más prometedoras para incrementar la biodisponibilidad oral de péptidos y proteínas [96,97]:

- modificación de las propiedades físico-químicas de las macromoléculas mediante la síntesis de nuevos derivados (p.ej., tecnología “cross-linked enzyme cristal” de Altus Biologics; plataforma HIM-2 de NOBEX/Biocon);
- adición de nuevas funciones a las macromoléculas para facilitar su absorción pasiva (p.ej., tecnología Eligen<sup>®</sup> de Emisphere Technologies);

- el uso de nuevos sistemas de administración de moléculas biológicamente activas.

En todos los casos es esencial que estas estrategias permitan mantener la actividad biológica de la macromolécula. En esta disertación, solamente nos referiremos a la última estrategia basada en el uso de los nuevos sistemas de administración.

Dentro de los nuevos sistemas para la administración oral de péptidos y proteínas, es necesario destacar los SEDDS (acrónimo en inglés de sistemas de administración de fármacos autoemulsionables) que dependiendo de su tamaño de gotícula pueden clasificarse en SMEDDS (sistemas de administración de fármacos automicroemulsionables) y SNEDDS (sistemas de administración de fármacos autonanoemulsionables).

Los SEDDS son mezclas isotrópicas de uno o varios lípidos junto con un tensioactivo, un cotensioactivo y la molécula biológicamente activa [98]. Esta mezcla (en general semisólida) forma rápidamente en presencia de agua y mediante una pequeña agitación una emulsión de tipo aceite-en-agua (O/A) que dependiendo del tamaño de gotícula se puede identificar como SMEDDS o SNEDDS. En general los lípidos que suelen ser utilizados para la preparación de estos sistemas incluyen ácidos grasos (ácido oleico, mirístico, caprilico, cáprico, etc.), glicéridos de ácidos grasos de cadena larga (aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, etc.), glicéridos de ácidos grasos de cadena media (Miglyol® 812, Captex® 335, Labrafac®) y cera de abejas. Como tensioactivos y cotensioactivos se utilizan Cremophor® (EL, RH40, RH60), D-alfa-tocoferol propilenglicol 1000 succinato, polisorbatos, monolaurato de sorbitano (Span 20), Labrafil® (M-1944CS, M-2125CS), Labrasol®, Solutol® HS 15 y fosfolípidos. Igualmente pueden entrar algún cosolvente, con propiedades co-tensioactivas, como PEG 400, etanol, propilenglicol o glicerina.

En cuanto a la preparación de los SEDDS, los diferentes componentes se mezclan bajo agitación, si necesario, a temperatura moderada (40°C). Una vez mezclado los diferentes excipientes, se añade la biomacromolécula que se disuelve o se dispersa (si se ha disuelto previamente en algún cosolvente) en la mezcla de lípidos. Finalmente, la mezcla resultante se dosifica en cápsulas de gelatina blanda o en cápsulas duras. En cualquier caso, el sistema autoemulsionable generará la emulsión bajo la agitación inducida por la motilidad gastrointestinal. La Tabla 9 recoge algunos medicamentos basados en sistemas autoemulsionables para la administración oral de péptidos.



Tabla 9. Ejemplos de medicamentos comercializados para la administración oral de péptidos y basados en sistemas autoemulsionables.

Nombre	Péptido	Composición
Sandimmun Neoral, Novartis	Ciclosporina A	Etanol, propilenglicol, macrogol glicerol hidroxiestearato (Cremophor® RH40)
Fortovase, Roche	Saquinavir	Mono- y diglicéridos de cadena media, polivinilpirrolidona, $\alpha$ -tocoferol
Norvir, Abbott	Ritonavir	Etanol, ácido oleico, butil hidroxitolueno, Chremophor® EL

Aparte de los sistemas autoemulsionables, otros transportadores de fármacos han sido propuestos para la administración oral de péptidos y proteínas. Entre ellos destacan las nanopartículas, las microemulsiones, los sistemas poliméricos de tipo dendrímero y ciertos tipos de liposomas [99,100]. La Tabla 10 resume alguna de dichas tecnologías que están actualmente en desarrollo por parte de diferentes Compañías. En cualquier caso, hasta el momento, ninguno de estos nanotransportadores ha conseguido llegar a mercado.

Tabla 10. Nanotransportadores bajo desarrollo por diferentes Compañías para la administración oral de biomacromoléculas.

Compañía	Sistema	Plataforma	Características
BioSanté	Nanopartículas de fosfato cálcico	BioOral™	Protege proteínas de degradación ácida y aumenta su permeabilidad intestinal
Apollo Life Science	Nanopartículas	Oradel™	Protege proteínas frente degradación enzimática y facilita su transporte hacia el intestino
Provalis PLC	Microemulsiones basadas en lípidos	Macrulin™	Protege frente a proteólisis y pH ácido e incrementa absorción
Endorex Corp.	Liposomas polimerizados	Orasome™	Protege de degradación en estómago y parte superior intestino

## **4. Conclusiones**

Los medicamentos basados en péptidos y proteínas representan una fracción importante, y creciente, del arsenal terapéutico actual. Tradicionalmente, su formulación ha sido diseñada para su administración a través de una vía de administración parenteral. Sin embargo, la corta vida media de péptidos y proteínas en condiciones fisiológicas así como una frecuente asociación de estas biomacromoléculas a requerimientos propios de terapias crónicas, hacen necesaria pautas de administración muy repetitivas de estos preparados parenterales. En esos casos, la necesidad de recibir frecuentes inyecciones así como su asociación con niveles plasmáticos oscilantes y variables, llevan a una baja aceptación por parte de los pacientes.

Para solventar algunos de esos problemas, la administración de estas biomacromoléculas a través de las mucosas del organismo puede ser una estrategia acertada. Sin embargo, estos compuestos biológicos administrados a través de mucosas (y principalmente para la vía oral) se enfrentan a diferentes barreras que dificultan de forma muy severa su absorción o su llegada al lugar de acción. En este contexto, y fundamentalmente en los últimos años, se han propuesto un amplio número de tecnologías y estrategias de formulación con el fin de incrementar la estabilidad y eficacia de terapias basadas en proteínas y péptidos. Hoy en día, todavía se requieren grandes esfuerzos para continuar el desarrollo de nuevos sistemas de administración que hagan posible la puesta en clínica de estos medicamentos. En cualquier caso, el uso de las mucosas para la administración de estos medicamentos permite identificar una importante panoplia de ventajas, incluyendo una mejor implementación de tratamientos crónicos sin necesidad de utilizar sistemas de administración invasivos (agujas) así como minimizar la actuación directa de profesionales sanitarios en la administración de la medicación o evitar capacidades de fabricación sofisticadas para asegurar la esterilidad.

## **5. Bibliografía**

La información relativa a la composición de los diferentes medicamentos indicados en este texto proviene de las fichas técnicas de la FDA (Food and Drug Administration) y de la EMEA (European Medicines Agency) así como del Dictionnaire Vidal (Vidal.fr - La base de données en ligne des prescripteurs libéraux, < <https://www.vidal.fr/>>).

- [1] Pennisi E. Bioinformatics. Gene counters struggle to get the right answer. *Science* 301, 1040–1041 (2003).
- [2] Venter JC. et al. The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351 (2001).
- [3] Reichert JM. Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. *Nature Rev. Drug Discov.* 2, 695–702 (2003).
- [4] Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Rev. Drug Discov.* 7, 21–39 (2008)
- [5] Carter PJ. Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. *Exp. Cell Res.* 317, 1261–1269 (2011).
- [6] Giles F, Estey E, O’Brien S. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer* 98, 2095–2104 (2003).
- [7] Wiseman GA, Witzig TE. Yttrium-90 (90Y) Ibritumomab tiuxetan (Zevalin®) induces long-term durable responses in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin’s lymphoma. *Cancer Biother. Radiopharm.* 20, 185–188 (2005).
- [8] Brown L. Commercial challenges of protein drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 29–42 (2005).
- [9] Biologics still on top in best selling drugs of 2013 <http://cellculturedish.com/2014/03/top-ten-biologics-2013-us-pharmaceutical-sales-2/>. Fecha de consulta: 3 enero 2016.
- [10] 10 Biologics on best selling drugs list for 2014 <http://cellculturedish.com/2015/03/10-biologics-on-best-selling-drugs-list-for-2014/>. Fecha de consulta: 3 enero 2016.
- [11] European Pharmacopoeia 2011, 7th Ed., VV.AA., Council of Europe. 2011
- [12] Apte SP, Ugwu SO. A review and classification of emerging excipients in parenteral medications. *Pharm. Technol.* March, 46–60 (2003).
- [13] Blackshear PJ, Rohde TD, Palmer JL, Wigness BD, Rupp WM, Buchwald H. Glycerol prevents insulin precipitation and interrup-

- tion of flow in an implantable insulin infusion pump. *Diabetes Care* 6, 387-392 (1983).
- [14] Kniker WT, Anderson CT, McBryde JL, Roumiantzeff M, Lessor B. Multitest CMI for standardized measurement of delayed cutaneous hypersensitivity and cell-mediated immunity. Normal values and proposed scoring system for healthy adults in the USA. *Ann Allergy*. 52, 75-82 (1984).
- [15] Chang BS, Hershenson S, Practical approaches to protein formulation development in “Rationale Design of stable protein formulations-theory and practice” (JF Carpenter and MC Manning eds.). Kluwer Academic/ Plenum publishers, New York, 1-25 (2002).
- [16] Kamerzella TJ, Esfandiaryb R, Joshib SB, Middaughb CR, Volkinb DB. Protein–excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Adv. Drug Del. Rev.* 63, 1118-1159 (2011).
- [17] Ohtake S, Kita Y, Arakawa T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 1053-1073 (2011).
- [18] Shalaev EY. The impact of buffer on processing and stability of freeze-dried dosage forms. *Am. Pharm. Rev.* 8, 80-87 (2005).
- [19] Shalaev EY, Wang W, Gatin LA. Rational choice of excipients for use in lyophilized formulations In “Protein formulation and delivery” (EJ McNally and JE Hastedt eds.). Informa Healthcare, New York, 197-217 (2008).
- [20] Gomez G, Pikal MJ, Rodriguez-Hornedo N. Effect of initial buffer composition on pH changes during far-from equilibrium freezing of sodium phosphate buffer solutions. *Pharm Res.* 18, 90-97 (2001).
- [21] Shalaev EY, Johnson-Elton TD, Chang L, Pikal MJ. Thermophysical properties of pharmaceutically compatible buffers at sub-zero temperatures: implications for freeze-drying. *Pharm Res.* 19, 195-201 (2002).
- [22] Jennings TA. Effect of formulation on lyophilization, part 1. *IVD Technology Magazine*, 1997.
- [23] Pikal MJ. Freeze-drying of proteins. Part II: Formulation selection. *BioPharm.* 3, 26-30 (1990).

- [24] Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579–599 (1992).
- [25] Crowe LM, Reid DS, Crowe JH. Is trehalose special for preserving dry materials? *Biophys. J.* 71, 2087–2093 (1996).
- [26] Carpenter JF, Chang BS, Garzon-Rodriguez W, Randolph TW. Rationale design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice In “Rationale Design of stable protein formulations - theory and practice” (JF Carpenter and MC Manning eds.). Kluwer Academic/ Plenum publishers, New York, 109-133 (2002).
- [27] Vaishya R, Khurana V, Patel S, Mitra AK. Long-term delivery of protein therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv.* 12, 415-440 (2015).
- [28] Agarwal P, Rupenthal ID. Injectable implants for the sustained release of protein and peptide drugs. *Drug Discov. Today* 18, 337-349 (2013).
- [29] Packhaeuser CB, Schnieders J, Oster CG, Kissel T. In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 445-455 (2004).
- [30] Wex J, Sidhu M, Odeyemi I, Abou-Setta AM, Retsa P, Tombal B. Leuprolide acetate 1-, 3- and 6-monthly depot formulations in androgen deprivation therapy for prostate cancer in nine European countries: evidence review and economic evaluation. *Clinicoecon. Outcomes Res.* 5, 257-269 (2013).
- [31] Eligard. Medigene AG. <<http://www.medigene.com/products-pipeline/products/eligard>>. Fecha de consulta: 3 enero 2016.
- [32] The Vantas® implant. <<http://www.vantasimplant.com/the-vantas-implant/>>. Fecha de consulta: 3 enero 2016.
- [33] DURECT: DUROS® System. <[http://www.durect.com/wt/durect/page\\_name/duros](http://www.durect.com/wt/durect/page_name/duros)>. Fecha de consulta: 3 enero 2016.
- [34] Bochot A, Fattal E, Gulik A, Couarraze G, Couvreur P. Liposomes dispersed within a thermosensitive gel: a new dosage form for ocular delivery of oligonucleotides. *Pharm. Res.* 15, 1364–1369 (1998)
- [35] Yong CS, Choi JS, Quan QZ, Rhee JD, Kim CK, Lim SJ, Kim KM, Oh PS, Choi HG. Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium. *Int. J. Pharm.* 226, 195–205 (2001).

- [36] Rathi RC, Zentner GM, Jeong B, Biodegradable low molecular weight triblock lactide-glycolide-polyethylene glycol copolymers having reverse thermal gelation properties. US Patent 6,201,072 (2001).
- [37] Cha Y, Choi YK, Bae YH. Thermosensitive biodegradable polymers based on poly(ether-ester) block copolymers. PCT Int. Appl. 9,715,287 (1997).
- [38] Zentner GM, Rathi R, Shih C, McRea JC, Seo MH, Oh H, Rhee BG, Mestecky J, Moldoveanu Z, Morgan M, Weitman S. Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs. *J. Control. Release* 72, 203–215 (2001).
- [39] Vintiloiu A, Leroux C. Organogels and their use in drug delivery — A review. *J. Control. Release* 125, 179–192 (2008).
- [40] Sahoo S, Kumar N, Bhattacharya C, Sagiri SS, Jain K, Pal K, Ray SS, Nayak B. Organogels: properties and applications in drug delivery. *Des. Monomers Polym.* 14, 95–108 (2011).
- [41] Gouin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Tech.* 15, 330–347 (2004).
- [42] Pagels RF, Prud'homme RK. Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides, biologics, and soluble therapeutics. *J. Control. Release* 219, 519–535 (2015).
- [43] Teekamp N, Duque LF, Frijlink HW, Hinrichs WL, Olinga P. Production methods and stabilization strategies for polymer-based nanoparticles and microparticles for parenteral delivery of peptides and proteins. *Expert Opin. Drug Deliv.* 12, 1311–1331 (2015).
- [44] Schwendeman SP, Shah RB, Bailey BA, Schwendeman AS. Injectable controlled release depots for large molecules. *J Control Release* 190, 240–253 (2014).
- [45] Ma G. Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: strategy, preparation, and applications. *J. Control. Release* 10, 193:324–340 (2014).
- [46] Patel A, Cholkar K, Mitra AK. Recent developments in protein and peptide parenteral delivery approaches. *Ther Deliv.* 5, 337–365 (2014).
- [47] Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingre-

- dients: an overview. *Food Res. Int.* 40, 1107-1121 (2007).
- [48] King TW, Patrick CW. Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/polyethylene glycol microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique. *J. Biomed. Materials Res.* 51, 383–390 (2000).
- [49] Wolf M, Wirth M, Pittner F, Gabor F. Stabilisation and determination of the biological activity of asparaginase in poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *Int. J. Pharm.* 256, 141–152 (2003).
- [50] Stureson J, Carlfors J. Incorporation of protein in PLG microspheres with retention of bioactivity. *J. Control. Release* 67, 171–178 (2000).
- [51] Tracy MA. Development and scale-up of a microsphere protein delivery system. *Biotechnol. Prog.* 14, 108-115 (1998).
- [52] Irache JM, Esparza I, Gamazo C, Agüeros M, Espuelas S. Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Vet. Parasitol.* 180, 47-71 (2011).
- [53] Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 347-360 (2003).
- [54] Duncan R, Ringsdorf H, Satchi-Fainaro R. Polymer therapeutics-polymers as drugs, drug and protein conjugates and gene delivery systems: past, present and future opportunities. *J. Drug Target.* 14, 337-341 (2006).
- [55] Heredia KL, Maynard HD. Synthesis of protein-polymer conjugates. *Org. Biomol. Chem.* 5, 45–53 (2007).
- [56] Gamazo C, Martín-Arbella N, Brotons A, Camacho AI, Irache JM. Mimicking microbial strategies for the design of mucus-permeating nanoparticles for oral immunization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96, 454-463 (2015).
- [57] Tan ML, Choong PF, Dass CR. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides* 31, 184-193 (2010).
- [58] Martins S, Sarmiento B, Ferreira DC, Souto EB. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery-liposomes versus lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 2, 595–607 (2007).

- [59] Swaminathan J, Ehrhardt C. Liposomal delivery of proteins and peptides. *Expert Opin. Drug Deliv.* 9, 1489–1503 (2012).
- [60] Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Administration strategies for proteins and peptides. *Int. J. Pharm.* 477, 578-589 (2014).
- [61] Sharma AR, Kundu SK, Nam JS, Sharma G, Priya Doss CG, Lee SS, Chakraborty C. Next generation delivery system for proteins and genes of therapeutic purpose: why and how? *Biomed. Res. Int.* 2014, 327950 (2014).
- [62] Mantripragada S. A lipid based depot (DepoFoam technology) for sustained release drug delivery. *Prog. Lipid Res.* 41, 392–406 (2002).
- [63] How DepoFoam® works. Pacira Pharmaceuticals, Inc. <<http://www.pacira.com/depof foam-platform/how-it-works.php>>. Fecha de consulta: 3 enero 2016.
- [64] Du AW, Stenzel MH. Drug carriers for the delivery of therapeutic peptides. *Biomacromolecules* 15, 1097-1114 (2014).
- [65] Silva AC, Lopes CM, Lobo JM, Amaral MH. Delivery systems for biopharmaceuticals. Part I: Nanoparticles and microparticles. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16, 940-954 (2015).
- [66] Washington N, Washington C, Wilson C, *Physiological Pharmaceutics. Barriers to drug absorption.* CRC Press. (2000).
- [67] Banga AK. *Therapeutic Peptides and Proteins: formulation, processing and delivery systems* 2nd Edition. Taylor and Francis. (2006).
- [68] Agu RU, Ugwoke MI, Armand M, Kinget R, Verbeke N, The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir. Res.* 2, 198–209 (2001).
- [69] Chrystyn H. Is total particle dose more important than particle distribution. *Respir. Med.* 91, 17–19 (1997).
- [70] Onoue S, Suzuki H, Seto Y. Formulation approaches to overcome biopharmaceutical limitations of inhaled peptides/proteins. *Curr Pharm Des.* 21, 3867-3874 (2015).
- [71] Cun D, Wan F, Yang M. Formulation strategies and particle engineering technologies for pulmonary delivery of biopharmaceuticals. *Curr. Pharm. Des.* 21, 2599-2610 (2015).



- [72] Hertel SP, Winter G, Friess W. Protein stability in pulmonary drug delivery via nebulization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 93, 79-94 (2015).
- [73] Loira-Pastoriza C, Todoroff J, Vanbever R. Delivery strategies for sustained drug release in the lungs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75, 81-91 (2014).
- [74] Muralidharan P, Malapit M, Mallory E, Hayes DJr, Mansour HM. Inhalable nanoparticulate powders for respiratory delivery. *Nano-medicine.* 11, 1189-1199 (2015).
- [75] Fortuna A, Alves G, Serralheiro A, Sousa J, Falcão A. Intranasal delivery of systemic-acting drugs: small-molecules and biomacromolecules. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88, 8-27 (2014)
- [76] Ugwoke MI, Verbeke N, Kinget R. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 3-21 (2001).
- [77] Cornaz AL, Buri P. Nasal mucosa as an absorption barrier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40, 261-270 (1994).
- [78] Sanders P, Washington N, Frier M, Wilson CG, Feely LC, Washington C. The deposition of solution-based and suspension-based aerosols from metered dose inhalers in healthy subjects and asthmatic patients. *STP. Pharm. Sci.* 7, 300-306 (1997).
- [79] Arora P, Sharma S, Garg S. Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discov. Today* 7, 967-975 (2002).
- [80] Schipper NG, Verhoef JC, Merkus FW. The nasal mucociliary clearance: relevance to nasal drug delivery. *Pharm. Res.* 8, 807-814 (1991).
- [81] Jones N. The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 251, 5-19 (2001).
- [82] Ozsoy Y, Gungor S, Cevher E. Nasal delivery of high molecular weight drugs. *Molecules* 14, 3754-3779 (2009).
- [83] Aegis Therapeutics LLC. <<http://aegisthera.com/>>. Fecha de consulta: 3 enero 2016.
- [84] Maggio ET. Intravail: highly effective intranasal delivery of peptide and protein drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* 3, 529-539 (2006).
- [85] Steyn D, du Plessis L, Kotzé A. Nasal delivery of recombinant human growth hormone: in vivo evaluation with Pheroid™ tech-

- nology and N-trimethyl chitosan chloride. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 13, 263 – 273 (2010).
- [86] Du Plessis LH, Lubbe J, Strauss T, Kotzé AF. Enhancement of nasal and intestinal calcitonin delivery by the novel Pheroid™ fatty acid based delivery system, and by N-trimethyl chitosan chloride. *Int. J. Pharm.* 385, 181-186 (2010).
- [87] West Pharma. <<http://www.westpharma.com>>. Fecha de consulta: 3 enero 2016.
- [88] Casettari L, Illum L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *J. Control Release.* 190:189-200 (2014).
- [89] Lalatsa A, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Strategies to deliver peptide drugs to the brain. *Mol. Pharm.* 11, 1081-1093 (2014).
- [90] Mignani S, El Kazzouli S, Bousmina M, Majoral JP. Expand classical drug administration ways by emerging routes using dendrimer drug delivery systems: a concise overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1316-1330 (2013).
- [91] Smart JD. Buccal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 507-517 (2005).
- [92] Caon T, Jin L, Simões CM, Norton RS, Nicolazzo JA. Enhancing the buccal mucosal delivery of peptide and protein therapeutics. *Pharm. Res.* 32, 1-21 (2015).
- [93] Generex Biotechnology. <<http://www.generex.com/>>. Fecha de consulta: 3 enero 2016.
- [94] Bernstein G. Delivery of insulin to the buccal mucosa utilizing the RapidMist system. *Expert Opin. Drug Deliv.* 5, 1047–1055 (2008).
- [95] Pathak K, Raghuvanshi S. Oral bioavailability: issues and solutions via nanoformulations. *Clin. Pharmacokinet.* 54, 325-357 (2015).
- [96] Park K, Kwon IC, Park K. Oral protein delivery: current status and future prospect. *React. Funct. Polym.* 71, 280–287(2011).
- [97] Hoffman A, Qadri B. Eligen insulin--a system for the oral delivery of insulin for diabetes. *IDrugs* 11, 433-441 (2008).
- [98] Müllertz A, Ogbonna A, Ren S, Rades T. New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery

- of poorly soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1622-1636 (2010).
- [99] Pridgen EM, Alexis F, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticle drug delivery technologies for oral delivery applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* 12, 1459-1473 (2015).
- [100] Patel A, Patel M, Yang X, Mitra AK. Recent advances in protein and Peptide drug delivery: a special emphasis on polymeric nanoparticles. *Protein Pept. Lett.* 2014;21(11):1102-20 (2014).

