

# Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas

✉ Vivian Saez<sup>1</sup>, José Ramón Hernández<sup>1</sup>, Carlos Peniche<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Desarrollo de Formulaciones, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: vivian.saez@cigb.edu.cu

<sup>2</sup>Centro de Biomateriales, Universidad de La Habana, UH Ave. Universidad e/ G y Ronda AP 6120, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba

REVISIÓN

## RESUMEN

Recientemente, la microencapsulación se ha convertido en una alternativa importante para desarrollar sistemas novedosos de liberación de péptidos y proteínas. Entre las numerosas técnicas diseñadas para microencapsular sustancias de diversa naturaleza, la polimerización interfacial, el secado por atomización y la evaporación de solvente, han sido las más estudiadas para encapsular biomoléculas. La de doble emulsión- evaporación de solvente es la más utilizada con fines investigativos y para la obtención de los productos que se encuentran en el mercado. La encapsulación de proteínas por este método es un procedimiento complejo, en el cual intervienen numerosos factores que definen las características del producto final y la estabilidad de la molécula encapsulada. Este artículo ofrece información actualizada acerca de las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas; las principales técnicas para microencapsular estos fármacos; los parámetros para caracterizar las microesferas y la proteína encapsulada; así como un análisis de las condiciones experimentales que más inciden en la estabilidad de estas biomoléculas, frente al proceso de microencapsulación por la técnica de doble emulsión- evaporación de solvente; y por último, las estrategias de estabilización que se han desarrollado para conservar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las proteínas encapsuladas.

**Palabras clave:** microesferas, PLGA, liberación controlada, liberación de proteínas

*Biotecnología Aplicada 2007;24:98-107*

## ABSTRACT

**Microspheres as delivery systems for the controlled release of peptides and proteins.** Microencapsulation of peptides and proteins has recently become a relevant alternative to develop novel drug-delivery systems. Among techniques designed to microencapsulate substances of different nature, the interfacial polymerization, spray-drying and solvent evaporation techniques are those most widely studied for encapsulation of biomolecules. The double emulsion/solvent evaporation procedure is most commonly applied for this kind of product that is available in the market. On the other hand, this method of protein encapsulation is a rather complex process, involving several factors that determine the properties of the final product and the stability of the encapsulated molecule. In this paper, we offer an updated overview on the use of microspheres as systems for the controlled release of proteins and peptides, the main techniques used for microencapsulation of such biomolecules, and the parameters considered for characterizing the microspheres and the encapsulated protein. Experimental conditions influencing their stability during the double emulsion/solvent evaporation microencapsulation procedures, and strategies used to preserve and stabilize the physicochemical and biological properties of the encapsulated proteins are also discussed.

**Keywords:** microspheres, PLGA, controlled release, protein delivery

## Introducción

Por sus importantes funciones en el organismo, desde hace varias décadas se estudian las proteínas como posibles agentes terapéuticos. Sin embargo, no fue hasta el surgimiento de la era biotecnológica que las investigaciones cobraron auge, debido al desarrollo de eficientes procesos de producción de estas biomoléculas, los cuales han permitido disponer de cantidades suficientes para el desarrollo de productos biofarmacéuticos.

Actualmente existen varias proteínas que se utilizan como principio activo de diversas formas farmacéuticas, que se venden en el mercado internacional (Tabla 1). Sin embargo, cuando las proteínas se emplean como agentes terapéuticos, presentan algunas limitaciones; entre ellas, su inestabilidad fisicoquímica en algunos fluidos corporales (por ejemplo, en la saliva y en los

jugos gástricos), lo cual limita el uso de algunas vías de administración, como la vía oral. Además, el gran tamaño de estas biomoléculas limita el uso de la vía transdérmica. Por ello, la más utilizada para introducir las proteínas en el organismo es la vía parenteral. A los inconvenientes propios de esta vía, se les adicionan otros inherentes al comportamiento de las proteínas como principio activo: corto tiempo de vida media en el organismo, lo cual determina la necesidad de emplear una elevada frecuencia de administración; generación de efectos adversos propios de su mecanismo de acción o de efectos colaterales indeseados; y presencia de inmunogenicidad en algunos casos [1-4].

Debido a estas limitaciones, se trabaja en la búsqueda de nuevos sistemas de administración, que

1. Johnson OL, Jaworowicz W, Cleland J, Bailey L, Charnis M, Duenas E, *et al.* The stabilization and encapsulation of human growth hormone into biodegradable microspheres. *Pharm Res* (1997); 14:730-5.

2. Jones AJ, Putney S, Johnson OL, Cleland J. Recombinant human growth hormone poly (lactic-co-glycolic acid) microsphere formulation development. *Adv Drug Deliv Rev* (1997); 28:71-84.

3. Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature* (1998); 392:5-10.

4. Reddy KR. Controlled-release, pegylation, liposomal formulations: new mechanisms in the delivery of injectable drugs. *Ann Pharmacother* (2000); 34:915-23.

Tabla 1. Algunas proteínas terapéuticas que se encuentran disponibles en el mercado internacional en diversas formas farmacéuticas

Proteína	Producto	Compañía	Indicación
Eritropoyetina	Epogen	Amgen	Anemia asociada a falla renal
Interferón alfa-2b	Intron A Heberon alfa R	Schering-Plough HeberBiotec	Hepatitis C Hepatitis B y varios tipos de cáncer
Interferón alfa-2a	Roferon A	Roche	Cáncer de pulmón, hepatitis B, sarcoma de Kaposi, leucemia de células velludas
Interferón beta	Avonex	Biogen	Esclerosis múltiple
Insulina	Humulin	Eli Lilly	Diabetes mellitus
Estreptoquinasa	Estreptasa Heberkinasa	Aventis HeberBiotec	Infarto agudo del miocardio Infarto agudo del miocardio
Factor estimulador de colonias de granulocitos	Neupogen	Roche/Amgen	Neutropenia provocada por el tratamiento con citostáticos
Hormona de crecimiento	Genotropin Nutropin	Pfizer Genetech	Deficiencia de hormona de crecimiento en niños Deficiencia de hormona de crecimiento en niños
Interleucina	Proleukin	Chiron/Roche	Cáncer renal
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	Regranex	Johnson & Johnson	Úlceras neuropáticas de miembros inferiores en pacientes diabéticos

permitan aprovechar el potencial terapéutico de las proteínas con el mínimo de inconvenientes posible. Los tres sistemas que se han aplicado con mayor éxito con péptidos y proteínas son: los basados en la modificación química de las biomoléculas con polietilenglicol (PEGilación) y los que se basan en la encapsulación de las moléculas en sistemas lipídicos (liposomas) o poliméricos (microesferas).

La PEGilación es la conjugación de las proteínas con polietilenglicol (PEG). Esta idea surgió a finales de los años '60 del siglo XX, con los trabajos de Davis y cols. [5]. En sus inicios, el objetivo de la PEGilación fue la disminución de la inmunogenicidad de las proteínas. No obstante, posteriormente se demostraron otras características determinantes que la conjugación con PEG proporcionaba a las proteínas, tales como: mayor tiempo de vida en el organismo y mayor estabilidad térmica y frente a la acción de las proteasas. En la actualidad, el aumento del tiempo de vida *in vivo* es la característica más explotada de las que le proporciona el PEG al conjugado.

Los liposomas son vehículos coloidales formados por una bicapa de fosfolípidos, que contiene sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas. Las estructuras únicas de los liposomas les brindan propiedades interesantes. En los tejidos, ellos alteran la distribución de los fármacos encapsulados: aumentan su eficacia y disminuyen su toxicidad. Los liposomas también se pueden usar en el direccionamiento pasivo de los fármacos hacia los tejidos enfermos. En enfermedades asociadas con el incremento de la permeabilidad capilar (cáncer, infección, inflamación), los liposomas se concentran más en las zonas afectadas que en los tejidos sanos, pues los capilares sanos no dejan entrar a los liposomas [6].

En los últimos 20 años, se han estudiado las microesferas biodegradables de polímeros biocompatibles como sistemas de liberación controlada de péptidos y

proteínas. Generalmente, el fármaco está distribuido en la matriz polimérica y es liberado por dos mecanismos fundamentales: por la difusión a través de la matriz, y por la degradación del polímero, que lleva a la erosión de las partículas. Para ello se han empleado polímeros naturales y sintéticos; entre estos últimos se destacan los copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico.

En la tabla 2 se comparan las ventajas y las desventajas que ofrecen estos tres sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas [4].

De los tres sistemas para proteínas terapéuticas, el que más ha avanzado industrialmente es la PEGilación, que ya cuenta con varios productos en el mercado. Sin embargo, las limitaciones que se relacionan en la ta-

5. Davis F. The origin of pegnology. *Adv Drug Deliv Rev* (2002); 54:457-8.

6. Allen TA. Liposomes. Opportunities in drug delivery. *Drugs* (1997); 54:8-14.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de algunos de los sistemas de liberación más utilizados para péptidos y proteínas

Sistema	Ventajas	Desventajas
PEGilación	Mejora la farmacocinética del producto Poca fluctuación en la concentración del principio activo Disminuye la toxicidad del fármaco y la inmunogenicidad Incrementa el nivel de vida del paciente Incrementa la estabilidad fisicoquímica	Disminución de la actividad biológica En el proceso se pierde una fracción importante de las proteínas El producto final casi siempre es heterogéneo (isómeros de posición)
Liposomas	Mejora la farmacocinética del producto Disminuye la toxicidad del fármaco Permite el direccionamiento pasivo del fármaco	Captura por el sistema retículo endotelial Debilitamiento vascular Dificultad para producir una estabilidad fisicoquímica de larga duración
Microesferas	Mantienen niveles séricos del fármaco por largos períodos Poca fluctuación en la concentración del fármaco Mejora el nivel de vida del paciente	Perfil de liberación incompleto Inestabilidad de las proteínas frente a la microencapsulación

bla 2, sobre todo la disminución de la actividad biológica de la proteína y la heterogeneidad del producto final, hacen que muchas compañías y grupos de investigación se encuentren enfrascados en la microencapsulación de péptidos y proteínas para el desarrollo de formulaciones ventajosas de estos fármacos, con respecto a las formulaciones de liberación inmediata que ya existen.

### Microencapsulación: concepto, aplicaciones y principales técnicas para obtener las micropartículas

La microencapsulación es el recubrimiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos con una película de material polimérico o graso, que origina partículas micrométricas de flujo libre. El producto de este proceso tecnológico se denomina "micropartícula", "microcápsula" o "microesfera", y son sistemas que se diferencian en su morfología y estructura interna. Cuando las partículas son menores que 1  $\mu\text{m}$ , el producto del proceso de encapsulación recibe el nombre de "nanoesfera", "nanopartícula" o "nanocápsula" [7].

Al encapsular o recubrir un material sólido, se obtienen micropartículas que generalmente presentan una forma irregular, debido a que el material de cubierta se deposita en la superficie de las partículas que se encapsularán y adopta su forma original. Al encapsular gases se obtienen partículas compuestas de un núcleo gaseoso, rodeado de una película del material de cubierta, las cuales se denominan microcápsulas. Si la sustancia que se encapsulará es un líquido, una solución, una emulsión o una dispersión, se pueden obtener estructuras capsulares (microcápsulas) o matriciales (microesferas) (Figura 1). El tipo de estructura depende, en gran medida, del procedimiento de encapsulación empleado, así como de las propiedades de la sustancia que se encapsulará y del material de cubierta.

La microencapsulación surge en el año 1931, con la publicación de un estudio que describía la formación de microcápsulas de gelatina, según un procedimiento que se llamó "coacervación" [7]. Esta técnica fue objeto de múltiples variaciones durante los años 40, y su aplicación más importante se dirigió a la encapsulación de colorantes para la elaboración del papel para calcar.

En los años siguientes, la aplicación de la microencapsulación se extendió a diferentes ramas:

- La agricultura, en la microencapsulación de fertilizantes y pesticidas.

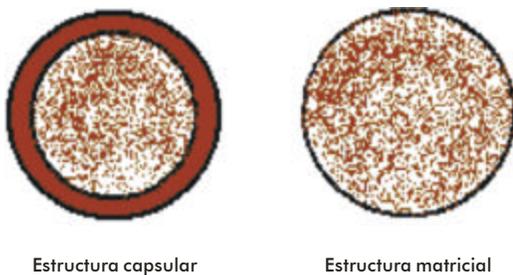


Figura 1. Tipos de estructura que presenta la partícula resultante del proceso de microencapsulación de un material líquido.

- Las construcciones navales, en la elaboración de cubiertas de tornillos y remaches con el objetivo de protegerlos contra la corrosión.

- La industria cosmética, en la elaboración de productos como desodorantes, champús, nebulizadores, para mejorar su estabilidad o biodisponibilidad.

- La industria médico-farmacéutica, en la cual se han explotado más ampliamente las bondades de la microencapsulación con diversos propósitos: enmascarar propiedades organolépticas indeseables que pueden presentar algunas sustancias (olor, color, sabor desagradable); aislar algún componente de una formulación sensible a las condiciones ambientales o también algún componente tóxico para los operarios o el ambiente; revestir partículas que, por su forma irregular, son difíciles de comprimir; convertir principios activos líquidos en sólidos, ya que son más fáciles de manipular; y sobre todo, en el diseño de formulaciones de liberación controlada de fármacos con diferentes fines.

La microencapsulación para el desarrollo de medicamentos comenzó en la década de los años 50 del siglo XX, cuando una compañía farmacéutica introdujo esta tecnología, con la finalidad de conseguir una liberación sostenida o prolongada de los fármacos [7]. Con esa intención y la de prevenir la irritación gástrica fue microencapsulada la aspirina, la cual aparece citada en la bibliografía como uno de los primeros medicamentos microencapsulados. A pesar de la aplicación tardía de este método en el campo de los medicamentos, su difusión fue muy rápida, y en un corto período llegó a ser una tecnología ampliamente extendida en la industria farmacéutica.

#### Material de recubrimiento

La variedad de materiales que pueden emplearse para la microencapsulación se ha ampliado gradualmente en la medida en que surgen nuevos biomateriales y se perfilan nuevas aplicaciones de esta técnica. De modo general, los materiales capaces de constituirse en micropartículas se clasifican en tres categorías: grasas, proteínas y polímeros [7].

#### Grasas

La cera de carnauba, el alcohol estearílico y el ácido esteárico son grasas que funden a una determinada temperatura y son erosionables por la acción de las lipasas que existen en la cavidad gástrica.

#### Proteínas

La gelatina fue el primer material utilizado en la microencapsulación, y es, en la actualidad, un material con un importante potencial. La albúmina y el colágeno también se han empleado en la obtención de micropartículas.

#### Polímeros

Debido a su gran versatilidad, la familia de los polímeros es la más utilizada en la microencapsulación de sustancias. Dentro de ella están los polímeros naturales, los semisintéticos y los sintéticos. Los polímeros naturales principalmente son de naturaleza polisacáridica, de origen animal y vegetal; se destacan

7. Remuñán C, Alonso MJ. Microencapsulación de medicamentos. En: Vilá-Jato JL. Tecnología Farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Madrid: Ed. Síntesis, SA; 1997:577-609.

el alginato, la dextrana, la goma arábiga y la quitosana. Los polímeros semisintéticos engloban los derivados de la celulosa, de los cuales existe una amplia variedad en el mercado con diferentes características de solubilidad. Por ejemplo, la etilcelulosa y el acetobutirato de celulosa son polímeros insolubles, mientras que el acetofalato de celulosa presenta una solubilidad dependiente del pH. Los polímeros sintéticos más utilizados son los derivados acrílicos y los poliésteres. Entre los derivados acrílicos están los polímeros insolubles con diferente grado de permeabilidad y también variedades con solubilidad dependiente del pH. Estos ofrecen amplias posibilidades para controlar la liberación del material encapsulado. Los poliésteres son polímeros de carácter biodegradable, lo que permite su administración por la vía parenteral. Entre ellos, los más conocidos son la poli-ε-caprolactona, el ácido poliláctico, y los copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico (PLGA, siglas en inglés).

De acuerdo con la aplicación del producto que va a ser microencapsulado, se selecciona el material adecuado. Sin embargo, es imprescindible que sea soluble en el solvente de elección; que produzca matrices o membranas homogéneas, con la porosidad deseada; que sea estable en las condiciones ambientales y en general en las condiciones en las que se almacene, e inerte frente a los demás compuestos que estén en contacto con él. Si se destinan al diseño de medicamentos, deben carecer de toxicidad y de actividad farmacológica.

Los materiales más empleados específicamente con fines farmacéuticos y sobre todo en la elaboración de microesferas que van a ser inyectadas son los homopolímeros del ácido láctico y los copolímeros de este con el ácido glicólico, debido a sus bondades en cuanto a biocompatibilidad y capacidad para lograr diferentes perfiles de liberación de los fármacos encapsulados.

### PLGA como matriz polimérica para la microencapsulación de fármacos

Los PLGA son poliésteres que se obtienen mediante la policondensación lineal de los hidroxiácidos o mediante la apertura del anillo de las lactonas correspondientes [8] (Figura 2).

Estos polímeros son solubles en solventes orgánicos como diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, acetona y tetrahidrofurano; pero no son solubles en agua. Algunos son cristalinos y otros amorfos, en dependencia de su composición en cuanto a ácido láctico y glicólico. Los amorfos son los más empleados en el diseño de formulaciones de liberación controlada. Ellos difieren en la proporción de los monómeros que lo componen, en su masa molecular (entre 5 y 100 kDa, aproximadamente) y en el grupo terminal (-COOH o -COOR). Estos tres parámetros determinan, en gran medida, su hidrofobicidad y su cinética de degradación, y a su vez, la eficiencia de encapsulación y la velocidad de liberación de la sustancia encapsulada [9].

El término biodegradable en estos polímeros se refiere a la hidrólisis de sus enlaces éster por contacto con los fluidos biológicos o artificiales. Esta reacción pro-

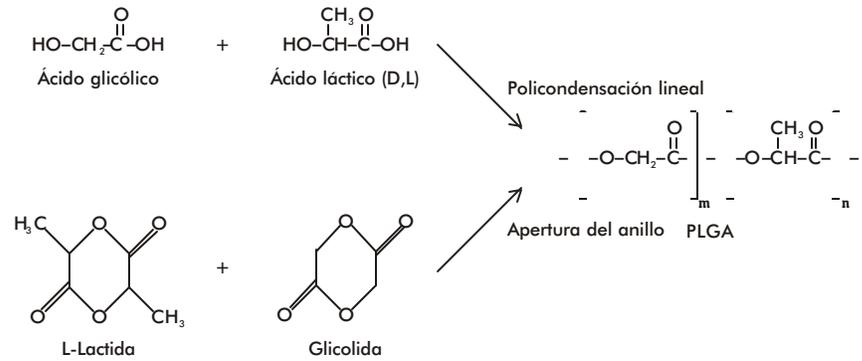


Figura 2. Vías de obtención de los copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico.

duce ácido láctico y glicólico, los cuales son metabolizados en el ciclo de Krebs hasta formar agua y CO<sub>2</sub> [9].

Al ser empleados como matrices en la obtención de microesferas, la degradación de estos polímeros ocurre en dos etapas. La primera comprende la escisión hidrolítica de los enlaces éster, llamada degradación, y en la cual se generan oligómeros y monómeros, con la consiguiente disminución de la masa molecular del polímero original. En la segunda etapa, llamada erosión, ocurre la pérdida de masa de la matriz, y la velocidad de escisión de los enlaces puede aumentar debido a la acción autocatalítica de los productos de degradación de naturaleza ácida [10]. Precisamente por no ser solubles en agua pero sí degradables por ella, son muy utilizados en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos.

Los PLGA son biocompatibles, ya que no provocan toxicidad cuando se introducen en el organismo por diferentes vías [11, 12]. De hecho, desde hace muchos años, estos polímeros se utilizan en la fabricación de hilo de sutura biodegradable, así como en la fabricación de dispositivos ortopédicos de fijación, tales como discos, tornillos y pernos [13].

### Técnicas de microencapsulación

Se han desarrollado disímiles métodos para lograr la microencapsulación de compuestos de naturaleza muy diversa, los cuales se dividen en tres grandes grupos: fisicoquímicos, químicos y mecánicos [7].

1. Métodos fisicoquímicos: han sido muy estudiados a escala de laboratorio.

a) Coacervación simple: se basa en la inducción de la desolvatación parcial del material de cubierta, que a continuación se deposita en la superficie de las partículas o gotículas de la sustancia que se recubrirá. La separación de fases puede ser inducida de diversas formas (adición de un no-solvente, cambio de temperatura, cambio de pH, adición de una sal o de un polímero incompatible).

b) Coacervación compleja: el proceso de separación de fases ocurre de forma espontánea, cuando en un medio acuoso se mezclan dos o más polímeros que presentan carga opuesta (policación y polianión), como consecuencia de la atracción electrostática entre ellos.

2. Métodos fisicomecánicos: son los más usados industrialmente, por lo factible de su ejecución.

8. Gilding PAR, Reed AM. Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/polylactic homo and copolymers 2. *in vitro* Degradation. *Polymer* (1981); 22:467-79.

9. Tamber H, Johansen P, Merkle HP, Gander B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* (2005); 57:357-76.

10. Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* (1996); 17:103-14.

11. Visscher GE, Robinson RL, Maulding HV, Fong JW, Pearson JE, Argenti GJ. Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly(D,L-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J Biomed Mater Res Part A* (1985); 19:349-65.

12. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of poly(lactide acid)/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* (1996); 17:93-102.

13. Eppley BL. Use of resorbable plates and screws in pediatric facial fractures. *J Oral Maxillofac Surg* (2005); 63:385-91.

a) Extracción / evaporación de solvente: a partir de una emulsión aceite-en-agua (o/w, siglas en inglés) o aceite-en-aceite (o/o, siglas en inglés), en cuya fase externa se incorpora un agente tensoactivo. En la fase interna se encuentra el material de cubierta disuelto y también la sustancia que se ha de recubrir: si es una molécula lipofílica, la sustancia estará disuelta; si es una molécula hidrofílica, como la mayoría de las proteínas, entonces estará dispersa. En este último caso se forma una emulsión doble: agua-en-aceite-en-agua (w/o/w, siglas en inglés) si la sustancia que se va a encapsular se dispersa en solución acuosa, o una dispersión del tipo s/o/w (siglas en inglés) si la sustancia se dispersa en forma sólida. La precipitación del material polimérico se logra al perderse el solvente por la extracción / evaporación de este, mediada por su coeficiente de reparto entre las fases de la emulsión. Si el material que se empleará como cubierta es soluble en agua, se utiliza una emulsión agua-en-aceite (w/o, siglas en inglés).

b) Secado por atomización: el principio activo se disuelve o dispersa en una solución del material de recubrimiento. Esta mezcla se pulveriza en una cámara, en cuyo interior circula aire caliente. De esta manera el disolvente se evapora y se obtienen las microesferas.

c) Recubrimiento en lecho fluido: las partículas de la sustancia que se recubrirá se suspenden en un lecho fluido y una solución del material de cubierta se atomiza sobre las partículas. De esta forma se deposita la cubierta sobre las partículas, que luego se solidifica por la acción del aire en el propio lecho.

3. Métodos químicos: son los más recientes, y han sido más empleados a escala de laboratorio que a escala industrial.

a) Polimerización interfacial: este proceso se produce en el seno de una emulsión. En la interfase se desarrolla un proceso de polimerización que da lugar a la formación de microcápsulas. Se puede partir de una emulsión en la que el monómero se encuentra disuelto en una de las fases y el iniciador en la otra, o de un sistema en el que se emplean dos monómeros, cada uno disuelto en una fase. En este último caso ocurre una policondensación en la interfase.

b) Polimerización heterogénea: la encapsulación ocurre en un sistema disperso en el que las micropartículas resultantes pueden tener tamaños variados, en dependencia de la técnica específica que se utilice: polimerización en emulsión (menor que 0.1 y hasta 5 µm); polimerización en emulsión sin surfactante (entre 0.5 y 5 µm); polimerización en emulsión activada por hinchamiento (entre 10 y 30 µm); polimerización sembrada (entre 1 y 20 µm); polimerización en suspensión (10 y mayor que 100 µm); polimerización en dispersión (entre 0.1 y 10 µm) y polimerización con precipitación (entre 0.1 y 100 µm).

## La microencapsulación de péptidos y proteínas en sistemas poliméricos basados en PLGA

### Ventajas potenciales

Las formulaciones de proteínas microencapsuladas en microesferas biodegradables pueden ofrecer una o

varias de las ventajas que se relacionan a continuación [3, 14, 15]:

1. Disminución de la frecuencia de administración, lo que lleva a una mayor aceptación por parte del paciente.

2. Aumento del beneficio terapéutico, debido a la eliminación de las fluctuaciones en los niveles séricos de la proteína.

3. Potencial disminución de la dosis total requerida para un tratamiento, debido a una mayor eficiencia en el aprovechamiento de la dosis administrada.

4. Potencial disminución de los efectos adversos, ya que disminuye la magnitud de la cantidad de proteína liberada en el organismo en el momento de la aplicación.

Las ventajas que potencialmente pueden tener las formulaciones de proteínas microencapsuladas, son las que han fomentado el desarrollo investigativo en este campo, y la aparición de nuevos métodos de microencapsulación, así como de aplicaciones de las nuevas formulaciones. Sin embargo, aún se encuentran pocos productos de esta naturaleza en el mercado. Actualmente se comercializan cuatro péptidos y una proteína microencapsulados (Tabla 3) [16].

### Técnicas más empleadas para microencapsular péptidos y proteínas

De las técnicas de microencapsulación relacionadas antes, solo algunas se emplean con más frecuencia en la obtención de microesferas cargadas con sustancias de naturaleza proteica, en lo fundamental por la fragilidad de estas moléculas frente a las condiciones experimentales de los procesos de microencapsulación.

Específicamente el método de coacervación simple mediante la adición de una sustancia no solvente, ha sido uno de los más estudiados para la microencapsulación de estas biomoléculas [17-21]. Este método

14. Putney SD, Burke P. Improving protein therapeutics with sustained-release formulation. *Nat Biotechnol* (1998); 16: 153-7.

15. Tracy M. Development and scale-up of a microsphere protein delivery system. *Biotechnol Prog* (1998); 14:108-15.

16. Burgess DJ, Crommelin DJA, Hussain AS, Chen M, EUFEPS. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report. *AAPS PharmSci* [serial online] (2004); 6:artículo 11. Disponible en: URL: <http://www.pharmscitech.com>.

17. Kent JS, Sanders LM, Lewis DH, Tice TR, inventors; SYNTAX INC (US), assignee. Microencapsulation of water soluble polypeptides. US Patent 207 864. 1985.

18. Lapka G, Mason NS, Thies C, inventors; Univ Washington (US), assignee. Process for preparation of microcapsules. US Patent 4 622 244. 1986.

19. Orsolini P, Mauvernay R-Y, Deghenghi R, inventors; DEBIOPHARM SA (CH), assignee. Microencapsulation by phase separation of water-soluble medicaments. US Patent 4 673 595. 1987.

20. Lewis DD. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer. In: Chasin M, Langer R, editors. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. New York: Marcel Dekker; 1990: 1-41.

21. Courveur P, Puisieux F. Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev* (1993); 10:141-62.

Tabla 3. Formulaciones farmacéuticas de péptidos y proteínas encapsulados en microesferas que se comercializan

Producto (Fecha)*	Principio activo	Compañía	Aplicación	Frecuencia de administración
Lupron Depot (1989)	Leuprolida	ABBOTT	Tratamiento paliativo del cáncer prostático avanzado	Mensual o trimestral
Sandostatin LAR (1998)	Octreotida	Novartis	Acromegalia y tumores endocrinos gastroenteropancreáticos	Mensual
Nutropin Depot (1999)	Somatropina (rhGH)	Genentech	Trastornos del crecimiento en pacientes pediátricos	Mensual o bimestral
Trelstar Depot (2000)	Triptorelin	Debio Recherche Pharmaceutique SA	Tratamiento paliativo del cáncer prostático avanzado	Mensual
Plenaxis (2003)	Abarelix	Praecis Pharmaceuticals	Tratamiento del cáncer prostático avanzado	Mensual

\* Fecha de aprobación por la Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU. (FDA, siglas en inglés).

permite una eficiencia de encapsulación elevada; pero la presencia de residuos de solvente en el producto final y la dificultad en el escalado del proceso, han restringido su empleo en la obtención de productos biofarmacéuticos [22]. Otra limitación de este método es la dificultad para obtener partículas de tamaño micrométrico [23].

El secado por atomización es otro de los métodos utilizados con el fin de encapsular biomoléculas. Este permite una elevada eficiencia de encapsulación y puede ser escalado con relativa facilidad; además, facilita realizar el proceso en condiciones asépticas [24]. Varios autores han evaluado diferentes características de la microcápsulas obtenidas por esta técnica; sin embargo, son pocos los que se refieren a la estabilidad de la proteína encapsulada. Durante el proceso de microencapsulación, el principio activo se expone a determinadas condiciones drásticas (presencia de solventes orgánicos y elevada temperatura), las cuales pueden dañar considerablemente la actividad de las proteínas. Por esta razón, resulta indispensable verificar la actividad biológica de cualquier proteína encapsulada por este método [25]. Otra limitación de este método radica en las pérdidas de producto final en la cámara de expansión del equipo que se emplea para obtener las micropartículas, y en la dificultad para controlar el tamaño de la partícula [26].

La polimerización interfacial ha sido otra de las técnicas empleadas en la microencapsulación de péptidos y proteínas [27-30]. La ventaja fundamental de este método estriba en que se puede realizar en condiciones suaves, que permiten conservar toda o gran parte de la actividad biológica de la proteína encapsulada. Sin embargo, la presencia de residuos del monómero en el producto final, es un inconveniente que ha limitado su uso en la obtención de un producto biofarmacéutico.

El método de evaporación de solvente a partir de una emulsión simple se ha utilizado fundamentalmente para encapsular algunos péptidos [31, 32]. En los últimos años se ha impuesto el empleo de una emulsión doble agua-en-aceite-en-agua (w/o/w, siglas en inglés) [33-36], para fármacos muy hidrofílicos, entre los que se encuentran las proteínas. Este método es el más usado a escala de laboratorio con fines investigativos [37-40], y a escala industrial se ha empleado para obtener la mayoría de los productos que se comercializan. Quizá esto se deba a la sencillez del procedimiento experimental y al equipamiento requerido. Su principal desventaja está relacionada con las condiciones propias del proceso, las cuales resultan drásticas para las proteínas [9, 41]. Por ejemplo, la exposición a solventes orgánicos y la agitación vigorosa para formar las emulsiones pueden llevar a una pérdida de la actividad biológica del fármaco [38, 42, 43]. Sin embargo, se ha logrado encapsular varias proteínas con un buen grado de conservación de su actividad biológica [34, 44].

Para obtener microesferas cargadas con un principio activo por este método, se parte de una solución del polímero en un solvente orgánico, en la cual se emulsiona o dispersa el fármaco disuelto o sólido, respectivamente. Esta emulsión se añade a una se-

gunda fase acuosa para formar la emulsión doble, la cual se agita para extraer / evaporar el solvente y propiciar la formación de las microesferas. Por último, las microesferas recién formadas se coleccionan, se lavan y se secan.

Por otra parte, se ha diseñado una variante que ha permitido encapsular la hormona de crecimiento humana con su actividad biológica casi intacta, y consiste en llevar a cabo el método de doble emulsión / evaporación de solvente a la temperatura del nitrógeno líquido, por lo que recibe el nombre de método criogénico [15, 45].

A pesar de las ventajas de este último método, su implementación no se ha generalizado, debido a la complejidad del equipamiento que se necesita. Quizá por su sencillez, el método de evaporación de solvente sigue siendo el más estudiado y el que ha sido probado para un mayor número de proteínas.

## Caracterización de las microesferas de PLGA cargadas con proteínas

De manera rutinaria, para la caracterización de cualquier muestra de microesferas, se determina un conjunto de parámetros: morfología, tamaño de la partícula, eficiencia de encapsulación, carga, perfil de liberación, solvente residual, entre otras características. Sin embargo, en las microesferas cargadas con proteínas se requiere, además, una caracterización exhaustiva de la molécula encapsulada. Ello se debe a la naturaleza lábil de estas sustancias, las cuales pueden experimentar cambios estructurales que afecten sus propiedades fisicoquímicas y biológicas y, en definitiva, la función que de ellas se desea como agentes terapéuticos.

### Parámetros para caracterizar las partículas

Aunque casi todos esos parámetros deben formar parte de los controles de calidad de las formulaciones farmacéuticas elaboradas con las microesferas, resulta necesario medirlos al concluir el proceso de fabricación de estas, ya que constituyen un producto intermedio en el proceso de formulación.

### Morfología

Los estudios morfológicos de las muestras de micropartículas revelan sus características importantes, tales como: forma, regularidad de la superficie, continuidad de la membrana (en las microcápsulas), presencia de poros y uniformidad de su distribución (en las partículas), así como el tamaño de estos, homogeneidad del tamaño (de las partículas), presencia de defectos (en las partículas) y agregación. Estos estudios permiten tener una idea del tamaño de las partículas, aunque no son los más apropiados para determinar este parámetro.

Estas características tienen repercusión en las propiedades y aplicaciones de las micropartículas obtenidas. Por ejemplo, la presencia de agregación resulta indeseable, ya que afecta la homogeneidad del producto elaborado; además, si se desea inyectar las partículas, las agujas se pueden taponar. A su vez, la cantidad y el tamaño de los poros pueden incidir en la liberación de

22. Thomasin C, Johansen P, Alder R, Bemsel R, Hottinger G, Altorf H, et al. A contribution to overcoming the problem of residual solvents in biodegradable microspheres prepared by coacervation. *Eur J Pharm Biopharm* (1996); 42:16-24.

23. Freitas S, Merkle HP, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release* (2005); 102:313-32.

24. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release* (2003); 90:261-80.

25. Gander B, Wehrli E, Alder R, Merkle P. Quality improvement of spray-dried, protein loaded D,L-PLA microspheres by appropriate polymer solvent selection. *J Microencapsul* (1995); 12:83-97.

26. Johansen P, Merkle HP, Gander B. Technological considerations related to the up-scaling of protein microencapsulation by spray-drying. *Eur J Pharm Biopharm* (2000); 50:413-7.

27. Longo WE, McCluskey RA, P Goldberg E, inventors; Univ Florida (US), assignee. Magnetically responsive, hydrophilic microspheres for incorporation of therapeutic substances and method of preparation thereof. US Patent 4 871 716. 1989.

28. DeLuca P, Rypacek F, inventors; Univ Kentucky Res Found (US), assignee. Biodegradable microspheres as carrier for macromolecules. EP O 245 820. 1991.

29. Cohen S, Bano C, Chow MB, Allcock HR, Langer R, inventors; Massachusetts Inst Technology (US); Penn State Res Found (US), assignees. Ionically cross-linked polymeric microcapsules. US Patent 5 308 701. 1994.

30. Calvo P, Sánchez A, Martínez J, López MI, Calonge M, Pastor JC, et al. Polyester nanocapsules as new topical ocular delivery systems for Cyclosporin A. *Pharm Res* (1996); 13:311-5.

31. Sánchez A, Alonso MJ. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) micro and nanospheres as a way to prolong blood/plasma levels of subcutaneously injected Cyclosporin A. *Eur J Pharm Biopharm* (1995); 41:31-7.

32. Orsolini P, inventors; Debio Recherche Pharmaceutique S.A., assignee. Process for the preparation of microspheres made of a biodegradable polymeric material. US Patent 5 445 832. 1995.

33. Meinel L, Illi OE, Zapf J, Malfanti M, Merkle HP, Gander B. Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release* (2001); 70:193-202.

34. Pérez C, Jesús PD, Griebenow K. Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method. *Int J Pharm* (2002); 248:193-206.

35. Pérez-Rodríguez C, Montano N, González K, Griebenow K. Stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin at the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/water interface and upon water-in-oil-in-water encapsulation in PLGA microspheres. *J Control Release* (2003); 89:71-85.

36. Feng L, Qi XR, Zhou XJ, Maitani Y, Wang SC, Jiang Y, et al. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres. *J Control Release* (2006); 112:35-42.

la sustancia encapsulada y hasta modificar el mecanismo por el cual ocurre esta liberación.

La morfología de las partículas se estudia mediante técnicas de microscopía, de las cuales la más empleada es la microscopía electrónica de barrido [25, 39, 46, 47]. Aunque con menor frecuencia, también se han usado otros tipos de microscopía; por ejemplo, la microscopía de fuerza atómica, fundamentalmente para el estudio de superficies de nanoesferas [48, 49]; la microscopía confocal, para obtener evidencias de la acidez generada en el interior de las microesferas, como consecuencia de la degradación del PLGA [50] o para estudiar la distribución de la proteína en el interior de la partícula [51]; y la microscopía de fluorescencia, para determinar la estructura interna de las partículas [52].

Las propiedades morfológicas de las micropartículas pueden ser definidas por la técnica de microencapsulación empleada y, particularmente, por las condiciones experimentales en que estas se obtengan. Por ejemplo, el tipo de solvente y su velocidad de evaporación pueden ocasionar diferencias importantes en la morfología de las partículas [53, 54]. También la adición de sales en alguna de las fases acuosas de la doble emulsión, o incluso en ambas, puede generar partículas con diferente estructura interna [55].

### Tamaño de la partícula

El tamaño de las microesferas es un parámetro importante. Para microesferas que van a ser administradas por la vía parenteral, este no debe ser superior a 180  $\mu\text{m}$  [56, 57]. Además, debe lograrse que sea reproducible entre los diferentes lotes, ya que puede influir en el perfil de liberación y en otros parámetros, tales como la eficiencia de encapsulación. Varias condiciones experimentales afectan el tamaño de las microesferas elaboradas mediante cualquiera de los métodos relacionados antes. El tipo de polímero y su masa molecular [58, 59], la proporción entre el polímero y el fármaco [59, 60], la concentración del polímero en la fase orgánica [61, 62], la concentración de alcohol polivinílico en la fase acuosa externa [60, 61, 63] y la velocidad de agitación en el momento de formar las partículas [64-66], son los factores que más inciden en este parámetro.

Por todo lo anterior, el tamaño de las microesferas y su distribución debe ser determinado cuidadosamente. Existen muchas técnicas para determinar esta característica en sistemas particulados de diversa naturaleza: centrifugación, sedimentación, ultracentrifugación analítica, conductividad eléctrica, microscopía óptica y electrónica, dispersión de la luz y difracción láser, entre otros [16]. Sin embargo, las diferencias entre los principios de medición de cada uno y los requerimientos de cada equipo para construir los modelos a partir de los datos experimentales, generan inconsistencia en los resultados de diferentes equipos al analizar una muestra. Todas las técnicas no cubren el rango de tamaños que pueden tener estos sistemas; sólo la microscopía electrónica posee esta ventaja. Burgess y cols. ofrecen un análisis exhaustivo de este tema y recomiendan seleccionar el método más apropiado para cada caso particular, teniendo en cuenta el proceso productivo, el tamaño de partícula requerido

para los lotes destinados a la clínica y la existencia de fenómenos de segregación de las partículas, de acuerdo con el tamaño durante los procesos de obtención y el almacenamiento de las formulaciones [16].

### Carga y eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación es la fracción, expresada en por ciento, de la proteína encapsulada con respecto a la cantidad total que se emplea para realizar el proceso [62]. Es un parámetro muy importante para indicar la calidad del proceso, que es mejor o más eficiente en la medida en que se logre encapsular una fracción mayor del fármaco.

A su vez, la carga es la cantidad de proteína encapsulada por la masa de las microesferas, y también se expresa en por ciento [62]. Este parámetro puede tener un rango de valores amplio, de acuerdo, fundamentalmente, con la dosis de la proteína que se requiere administrar y se debe determinar de forma exacta, justo porque define la cantidad de microesferas que deben incluirse en una dosis de la formulación.

Para determinar estos parámetros, se han utilizado varias formas de llevar la proteína encapsulada a una fase acuosa, en la cual pueda ser cuantificada adecuadamente. Entre ellas está la extracción en dos fases líquidas inmiscibles, la precipitación con solventes orgánicos seguida de filtración y la hidrólisis acelerada del polímero mediante la incubación de las microesferas en presencia de NaOH [67]. De estos tres procedimientos, el más generalizado es el último, ya que genera soluciones acuosas que luego de neutralizadas pueden analizarse por varios ensayos de cuantificación de proteínas totales: absorbancia a 280 nm o específicamente a la longitud de onda de máxima absorción para la proteína que se está estudiando, Lowry, Bradford y microBCA. Este último es el más empleado.

Estos parámetros se afectan grandemente por el método de encapsulación y por las condiciones experimentales en que se obtienen las micropartículas. Entre los factores que más los afectan están el volumen de la fase acuosa interna y la concentración de la proteína en ella, la concentración de polímero en la fase orgánica, el tipo de polímero, los tiempos de emulsificación, así como la presencia de aditivos en las diferentes fases de las emulsiones [62, 68, 69].

### Humedad residual

La presencia de agua en las partículas puede provocar fenómenos indeseables, tales como cambios en la matriz polimérica por la hidrólisis de los enlaces éster del polímero, o cambios en la proteína favorecidos por el medio húmedo [41]. Por esta razón, resulta importante determinar la humedad residual en las microesferas. El método de Karl-Fisher, que se emplea comúnmente para determinar la humedad de liofilizados, se ha utilizado también para determinar la cantidad de agua residual en las microesferas [45].

La humedad residual en las formulaciones basadas en microesferas depende, en gran medida, de la técnica de obtención de las partículas y del método para secarlas. La liofilización es el más generalizado a escala de

37. Cleland JL, Duenas E, Daugherty A, Marian M, Yang J, Wilson M, et al. Recombinant human growth hormone poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres provide a long lasting effect. *J Control Release* (1997); 49:193-205.

38. Péan JM, Venier-Julienne MC, Boury F, Menei P, Benoit D, Benoit JP. NGF release from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. Effect of some encapsulation parameters on encapsulated NGF stability. *J Control Release* (1998); 56:175-87.

39. Péan JM, F. Boury MCV-J, Menei P, Prout JE, Benoit JP. Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres? *Pharm Res* (1999); 16:1294-9.

40. Yang YY, Chia HH, Chung TS. Effect of preparation temperature on the characteristics and release profile of PLGA containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation. *J Control Release* (2000); 69:81-96.

41. Weert MV, Hennink WE, Jiskoot W. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharm Res* (2000); 17:1159-67.

42. Pistel KF, Bittner B, Koll H, Winter G, Kissel T. Biodegradable recombinant human erythropoietin loaded microspheres prepared from linear and star-branched block copolymers: Influence of encapsulation technique and polymer composition on particle characteristics. *J Control Release* (1999); 59:309-25.

43. Zhou S, Deng X, He S, Li X, Jia W, Wei D, et al. Study on biodegradable microspheres containing recombinant interferon-alpha-2a. *J Pharm Pharmacol* (2002); 54:1287-92.

44. Cohen S, Yoshioka T, Lucarelli M, Hwang LH, Langer R. Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharm Res* (1991); 8:713-20.

45. Herbert P, Murphy K, Johnson O, Dong N, Jaworowicz W, Tracy M, et al. A large-scale process to produce micro-encapsulated proteins. *Pharm Res* (1998); 15:357-61.

46. Lam XM, Duenas ET, Daugherty AL, Levin N, Cleland JL. Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes. *J Control Release* (2000); 67:281-92.

47. Kim HK, Park TG. Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release. *J Control Release* (2004); 98:115-25.

48. Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres. *Science* (1994); 263:1600-3.

49. Quellec P, Gref R, Perrin L, Dellacherie E, Sommer F, Verbavatz JM, et al. Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res* (1998); 42:45-54.

50. Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res* (2000); 17:100-6.

laboratorio para secar las microesferas cargadas con proteínas, debido a sus bondades en la conservación de sus propiedades. Para fabricar lotes industriales de microesferas, se ha utilizado el secado al vacío en equipos específicos. Con ambos métodos se han obtenido microesferas con baja humedad residual [45].

### Solvente residual

Los solventes residuales en formas farmacéuticas se definen como productos químicos orgánicos volátiles que se utilizan o se producen en la fabricación de excipientes y medicamentos. Debido a la toxicidad de estas sustancias, debe evitarse su presencia en cualquier medicamento. Sin embargo, la mayoría de las veces resulta imposible eliminarlos totalmente durante los procesos tecnológicos de producción; por tanto, deben ser cuantificados como parte del control de calidad de las formulaciones, y su contenido debe ser inferior al límite establecido por las agencias reguladoras [70].

La cromatografía gaseosa es la técnica más común para determinar esas sustancias en las microesferas [45, 53, 70], aunque recientemente se trata de introducir técnicas alternativas con este fin [71].

El método de encapsulación puede influir de forma notable en el contenido de solvente residual en las microesferas, así como en el tipo de solvente empleado [53].

Otro factor importante que afecta directamente este parámetro es el método de secado y las condiciones en que este se realiza.

### Perfil de liberación

El perfil de liberación es un parámetro de gran importancia al diseñar microesferas de proteínas con fines terapéuticos. Se estudia *in vitro* y puede relacionarse o no con las características de la liberación *in vivo*. No obstante, generalmente el estudio *in vitro* ofrece una idea de la potencialidad del sistema obtenido para la liberación controlada de proteínas.

La liberación de proteínas contenidas en microesferas de PLGA exhibe comúnmente un patrón compuesto por tres etapas. Una, de liberación inicial rápida, que por lo general ocurre durante el primer día. En lo fundamental está determinada por la proteína que se encuentra en la superficie de las microesferas, y de los poros y canales que componen la estructura interna de la micropartícula, los cuales se llenan con el medio de incubación durante las primeras horas del ensayo. Otra, de liberación lenta, en la que se libera muy poca o ninguna proteína. La última, de liberación más rápida, determinada por la erosión de las partículas [58]. En ocasiones, la liberación puede ocurrir en dos etapas y el perfil muestra una forma asintótica [67] (Figura 3).

A la liberación de la proteína contribuyen los procesos de difusión de esta a través de los poros y canales que tienen las partículas, y la exposición de las moléculas de proteína al medio de incubación, debido a la erosión superficial de las partículas, lo cual también ocurre como consecuencia de la degradación de la matriz polimérica. Los poros y canales de las micropartículas se forman como producto del propio proceso de fabricación o por la modificación de la estructura como consecuencia de la degradación del polímero [24]. Por

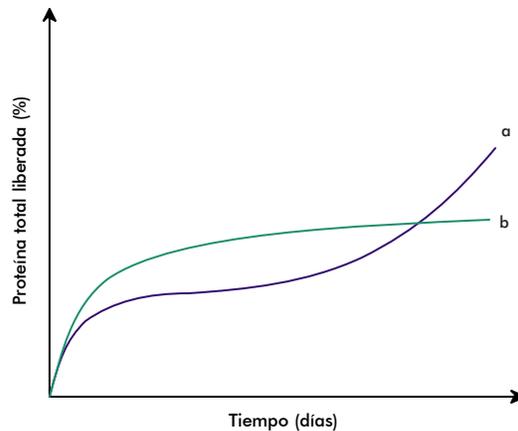


Figura 3. Patrones de liberación de las proteínas encapsuladas: a) en tres etapas, b) asintótico.

esta razón, existen varios factores que influyen en el perfil de liberación de las proteínas encapsuladas en microesferas de PLGA. Entre ellos se destacan las características de la matriz polimérica empleada y de la proteína encapsulada, la estructura de la micropartícula obtenida, la técnica de encapsulación y las condiciones experimentales en que esta se realiza, así como la coencapsulación de aditivos con fines diversos [72].

Además de las características de las microesferas que determinan el perfil de liberación, existen otros factores relacionados con las condiciones en que se realizan estos estudios, los que también pueden afectar la liberación; por ejemplo, la composición y el volumen del medio de incubación, la temperatura, el dispositivo que se emplee para estudiar el perfil, la forma y la velocidad de agitación, y el modo de recambiar el medio de incubación (parcial o completo) [46, 73, 74].

Al realizar los estudios de liberación en las microesferas cargadas con proteínas, a menudo se obtiene una gran variabilidad en los resultados, debido a la degradación de las biomoléculas, como consecuencia del efecto del medio ácido generado por los productos de degradación de la matriz polimérica y de la exposición de estas al medio acuoso. Este inconveniente puede ser resuelto cambiando el medio de incubación con frecuencia o midiendo la cantidad de proteína que queda en las microesferas en vez de la concentración en la solución de incubación [16].

### Esterilidad

Las formulaciones elaboradas con estos sistemas no pueden ser esterilizadas por vapor o por irradiación, ya que las propiedades de la matriz polimérica y de la biomolécula encapsulada pueden sufrir modificaciones indeseadas. Además, el tamaño de las partículas impide el empleo de la filtración para esterilizar el producto final. Estas limitaciones han obligado a producir estas formas farmacéuticas en condiciones asepticas, por lo que resulta de vital importancia verificar la esterilidad interna y externa de estas [16, 75].

### Caracterización de la proteína encapsulada

La caracterización que se debe hacer de la proteína encapsulada está estrechamente relacionada con la

51. Weert MV, Hof RV, Weerd JV, Heeren RMA, Posthuma G, Hennink WE *et al.* Lysozyme distribution and conformation in a biodegradable polymer matrix as determined by FTIR techniques. *J Control Release* (2000); 68:31-40.

52. Rahman NA, Mathiowitz E. Localization of bovine serum albumin in double-walled microspheres. *J Control Release* (2004); 94:163-75.

53. Bitz C, Doelker E. Influence of the preparation method on residual solvents in biodegradable microspheres. *Int J Pharm* (1996); 131:171-81.

54. Meng FT, Ma GH, Qiu W, Su ZG. W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *J Control Release* (2003); 91:407-16.

55. Pistel KF, Kissel T. Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using W/O/W double emulsion technique. *J Microencapsul* (2000); 17:467-83.

56. Bernstein H, Mathiowitz E, Morrel E, Brickner A, inventors; Alkermes Inc. assignee. Erythropoietin drug delivery system. WO Patent 9 325 221. 1993.

57. Khan A, Tracy MA, Bernstein H, inventors; Alkermes Inc., assignee. Composition and method for the controlled release of metal cation-stabilized interferon. US Patent 5 711 968. 1998.

58. Alonso MJ, Gupta RK, Min C, Siber GR, Langer R. Biodegradable microspheres controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine* (1994); 12:299-312.

59. Haznedar S, Dortunc B. Preparation and *in vitro* evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide. *Int J Pharm* (2004); 269:131-40.

60. Sun SW, Jeong YI, Jung SW, Kim SH. Characterization of FITC-albumin encapsulated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres and its release characteristics. *J Microencapsul* (2003); 20:479-88.

61. Cheng YH, Illum L, Davis SS. A poly (D,L-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol. *J Control Release* (1998); 55:203-12.

naturaleza de cada molécula particular, y debe poder reflejar las propiedades de esta para realizar su función. Por lo general se emplean técnicas cromatográficas, electroforesis en gel de poliacrilamida, ensayos inmunoenzimáticos y de actividad biológica.

Debido a que los PLGA no son solubles en agua, se requiere diseñar un procedimiento de extracción de la proteína encapsulada, para obtener muestras acuosas que resulten apropiadas para ser estudiadas por las técnicas antes mencionadas, y en las cuales la proteína conserve las propiedades que tenía dentro de la partícula. Se han referido varios métodos basados en la extracción de la proteína mediante el empleo de un sistema de dos fases líquidas inmiscibles [76]: la extracción por precipitación de la proteína con solventes orgánicos, en los cuales el polímero es soluble [67, 77], y la extracción mediante electroforesis [47, 78, 79]. Específicamente, la extracción en sistemas de dos fases líquidas inmiscibles ha sido utilizada por algunos investigadores con buenos resultados para la evaluación de las propiedades de péptidos encapsulados [40, 80, 81], mientras que otros autores han encontrado que el recobrado de la biomolécula puede verse afectado debido a que las proteínas tienden a distribuirse entre la interfase y la fase acuosa [67, 82]. Ello también puede producir cambios en la proteína extraída y alterar los resultados. No obstante, este tipo de extracción pudiera emplearse si se demostrara su aplicabilidad al sistema particular en estudio. Con los métodos de precipitación ocurre algo similar, existen proteínas que pueden experimentar interacciones con los materiales poliméricos en las condiciones en las que se realiza la extracción, lo cual lleva a obtener recobrados no cuantitativos. De manera general, todos tienen ventajas y desventajas, y pueden ser apropiados o no para la proteína de interés, de modo que para cada sistema debe seleccionarse el método adecuado.

Existe otro conjunto de técnicas que potencialmente pudieran emplearse para el estudio de las características de la proteína, sin necesidad de extraerla antes de las microesferas; sin embargo, sólo la espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier se ha empleado con buenos resultados [51, 83-85].

### Efecto de las condiciones experimentales en las características de las microesferas obtenidas por el método de doble emulsión- evaporación de solvente

La microencapsulación de una proteína es un proceso complejo, en el que las características del producto final dependen, de manera notable, de un conjunto de factores. A cada técnica de microencapsulación se asocia un grupo específico de factores que definen las características de las partículas obtenidas.

En la tabla 4 se relacionan los parámetros experimentales que inciden directamente en las propiedades de las microesferas cargadas con proteínas, las cuales se elaboran mediante la técnica de doble emulsión- evaporación de solvente [68, 86].

La magnitud del efecto de cada uno de los parámetros relacionados antes depende, a su vez, de la naturaleza de la molécula encapsulada. Por esta razón, resulta im-

Tabla 4. Principales parámetros experimentales que inciden en las características de las microesferas cargadas con proteínas, elaboradas por la técnica de doble emulsión- evaporación de solvente\*

Etapa del proceso	Parámetro
Primera emulsión	Concentración de la solución polimérica Composición y peso molecular del polímero Solvente orgánico Volumen de la fase orgánica Concentración de la proteína en la fase acuosa interna Volumen de la fase acuosa interna Medio para formar la emulsión (por ejemplo: homogenización o sonicación) Velocidad de agitación Velocidad de adición de la fase acuosa a la fase orgánica Tiempo de mezclado Temperatura y presión
Segunda emulsión	Volumen de la fase acuosa externa Naturaleza y concentración del agente emulsificante Medio para formar la emulsión Velocidad de adición de la primera emulsión a la fase acuosa Velocidad de agitación Tiempo de mezclado Temperatura y presión
Extracción del solvente	Volumen de la fase de extracción Presencia de aditivos o estabilizadores Velocidad de agitación Tiempo de extracción Temperatura y presión
Colección y lavado	Sistema empleado para la colección (por ejemplo: filtración o centrifugación) Volumen y composición de la solución de lavado Temperatura y presión
Secado	Método empleado (por ejemplo: liofilización, lecho fluido) Tiempo Humedad residual Adición de excipientes

\*Adaptada a partir de la referencia 68.

prescindible determinar el efecto de todos o, al menos, de algunos de los factores que más inciden en las características finales de las partículas, de modo que sea posible definirlos para lograr determinadas propiedades en una muestra específica. A menudo se emplean diseños experimentales factoriales fraccionarios o completos con este propósito, ya que permiten determinar, con la menor cantidad de experimentos posible, las variables experimentales de mayor incidencia en las propiedades de las microesferas y la magnitud del efecto de cada una de ellas [62, 87, 88].

### Estabilidad de las proteínas frente al proceso de microencapsulación por la técnica de doble emulsión- evaporación de solvente. Estrategias de estabilización

Como se ha mencionado, las características fisicoquímicas y biológicas de las proteínas pueden ser modificadas durante el proceso de microencapsulación. Las modificaciones más frecuentes son: la desnaturación, la agregación covalente y no covalente, la desamidación, la oxidación y el ensamblaje incorrecto de los puentes disulfuro [24, 89-91].

Muchas veces, la solución ha sido diseñar una estrategia de estabilización de la proteína frente a las condiciones agresivas del proceso de encapsulación, y determinar su efecto en el perfil de liberación [24, 41].

62. Péan JM, Venier-Julienne MC, Filmon R, Sergent M, Phan-Tan-Luu R, Benoit JP. Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles. *Int J Pharm* (1998); 166:105-15.

63. Kempen DHR, Lu L, Zhu X, Kim C, Jabbari E, Dhert WJA, et al. Development of biodegradable poly(propylene fumarate)/poly(lactic-co-glycolic acid) blend microspheres. I. Preparation and characterization. *J Biomed Mater Res Part A* (2004); 70A:283-92.

64. Lee SC, Oh JT, Jang MH, Chung SI. Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration. *J Control Release* (1999); 59:123-32.

65. Mateovic T, Kriznar B, Bogataj M, Mrhar A. The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres. *J Microencapsul* (2002); 19:29-36.

66. Dinarvand R, Moghadam SH, Mohammadyari-Fard L, Atyabi F. Preparation of biodegradable microspheres and matrix devices containing naltrexone. *AAPS Pharm SciTech* [serial online] 2003; 4:E34. Disponible en: URL: <http://www.pharmscitech.com>.

67. Sánchez A, Villamayor B, Guo Y, Melver J, Alonso MJ. Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Int J Pharm* (1999); 185:255-66.

Algunas de las soluciones empleadas por los diferentes investigadores para evitar la pérdida de actividad de las biomoléculas microencapsuladas aparecen en la tabla 5.

## Consideraciones finales

Aunque existen muchos estudios relacionados con la microencapsulación de péptidos y proteínas, muy pocos son los productos que se comercializan actualmente. Para ampliar el número de productos biofarmacéuticos basados en microesferas, es necesario lograr resultados satisfactorios en varios aspectos. Por ejemplo, se requiere el desarrollo de métodos de microencapsulación escalables, y que permitan encapsular estos principios activos sensibles sin afectar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. El diseño de procedimientos sencillos y adecuados para la caracterización de las biomoléculas encapsuladas, es otro de los problemas que se necesita resolver. Aunque todavía queda mucho por investigar para que las formulaciones de proteínas encapsuladas en microesferas se conviertan en formas farmacéuticas de fácil manufactura y control de calidad, constituyen sistemas de

Tabla 5. Estrategias y mecanismos de estabilización de las proteínas frente a las condiciones del proceso de microencapsulación por la técnica de doble emulsión- evaporación de solvente

Factor de estrés	Estrategia de estabilización	Mecanismo de estabilización
Interfase agua/solvente orgánico	Adición de azúcares, polioles, PEG Aumento de la concentración de la proteína Adición de otras proteínas Preencapsular la proteína en un núcleo hidrofílico	Aísla a la proteína de la interfase Disminuye la proporción interfase/proteína Competencia por la interfase Aísla a la proteína de la interfase
Contacto entre el PLGA y la proteína	Adición de otras proteínas Preencapsular la proteína en un núcleo hidrofílico	Competencia por el PLGA Blindaje contra el PLGA
Cizalla	Adición de surfactantes Reducción del tiempo de agitación Evitar el ultrasonido para formar la primera emulsión	Competencia por la interfase Minimiza el tiempo de exposición a la cizalla Disminuye la exposición a la cizalla
Secado	Adicionar agentes protectores para la liofilización Cambiar la liofilización por otro método de secado	Aumenta la energía libre de Gibbs para el plegamiento incorrecto de la proteína Ausencia de la etapa de congelación

liberación muy atractivos por las ventajas que brindan, lo cual es el principal elemento que impulsa el desarrollo acelerado de este campo de investigación.

68. Cleland JL. Solvent evaporation processes for the production of controlled release biodegradable microsphere formulations for therapeutics and vaccines. *Biotechnol Prog* (1998); 14:102-7.

69. Srinivasan C, Katare YK, Muthukumar T, Panda AK. Effect of additives on encapsulation efficiency, stability and bioactivity of entrapped lysozyme from biodegradable polymer particles. *J Microencapsul* (2005); 22:127-38.

70. Impurities: Guideline for residual solvents. ICH harmonised tripartite guideline. In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1997.

71. B'Hymer C. Residual Solvent Testing: A review of gas-chromatographic and alternative techniques. *Pharm Res* 2003; 20:337-44.

72. Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm* (2004); 282:1-18.

73. Yang J, Cleland JL. Factors affecting the *in vitro* release of recombinant human interferon- $\gamma$  (rhIFN- $\gamma$ ) from PLGA microspheres. *J Pharm Sci* (1997); 86:908-14.

74. Blanco-Prieto J, Besseghir K, Orsolini P, Heimgartner F, Deuschel C, Merkle HP, et al. Importance of the test medium for the release kinetics of a somatostatin analogue from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Int J Pharm* (1999); 184:243-50.

75. Burgess DJ, Hussain AS, Ingallinera TS, Chen M. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: AAPS Workshop Report, Cospon-sored by FDA and USP. *Pharm Res* (2002); 19:1761-8.

76. Dani BA, DeLuca PP. Preparation, characterization, and *in vivo* evaluation of Salmon Calcitonin microspheres. *AAPS PharmSciTech*

[serial online] 2001;2:artículo 22. Disponible en: URL: <http://www.pharmscitech.com>.

77. Johnson OL, Cleland JL, Lee HJ, Charnis M, Duenas E, Jaworowicz W, et al. A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone. *Nat Med* (1996); 2:795-9.

78. Park TG, Lu W, Crofts G. Importance of *in vitro* experimental conditions on protein release kinetics, stability and polymer degradation in protein encapsulated poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) microspheres. *J Control Release* (1995); 33:211-22.

79. Kim HK, Park TG. Microencapsulation of human growth hormone within biodegradable polyester microspheres: Protein aggregation stability and incomplete release mechanism. *Biotechnol Bioeng* (1999); 65:661-7.

80. Ravivarapu HB, Burton K, DeLuca PP. Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres. *Eur J Pharm Biopharm* (2000); 50:263-70.

81. Woo BH, Kostanski JW, Gebrekidan S, Dani BA, Thanoo BC, DeLuca PP. Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of 120-day poly(D,L-lactide) leuprolide microspheres. *J Control Release* (2001); 75:307-15.

82. Deng XM, Li XH, Yuan ML, Xiong CD, Huang ZT, Jia WX, et al. Optimization of preparative conditions for poly-DL-lactide-polyethylene glycol microspheres with entrapped *Vibrio Cholera* antigens. *J Control Release* (1999); 58:123-31.

83. Yang TH, Dong A, Meyer J, Johnson OL, Cleland JL, Carpenter JF. Use of Infrared Spectroscopy to assess secondary structure of Human Growth Hormone within biodegradable microspheres. *J Pharm Sci* (1999); 88:161-5.

84. Fu K, Griebenow K, Hsieh L, Klivanov AM, Langer R. FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres. *J Control Release* (1999); 58:357-66.

85. Capan Y, Jiang G, Giovagnoli S, Na KH, DeLuca PP. Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of human growth hormone. *AAPS PharmSciTech* [serial online] 2003; 4:artículo 28. Disponible en: URL: <http://www.pharmscitech.com>.

86. Cleland JL. Design and production of single immunization vaccines using polylactide polyglycolide microsphere system. In: Powell MF, Newman M, editors. *Vaccine Design: The Subunit Approach*. New York: Plenum Publishing; 1995. p.439-72.

87. Parikh RH, Parikh JR, Dubey RR, Soni HN, Kapadia KN. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing 5-Fluorouracil: Optimization of process parameters. *AAPS PharmSciTech* [serial online] 2003; 4:Artículo 13. Disponible en: URL: <http://www.pharmscitech.com>.

88. Prakobvaitayakit M, Nimmannit U. Optimization of polylactic-co-glycolic acid nanoparticles containing Itraconazole using 2<sup>3</sup> factorial design. *AAPS PharmSciTech* [serial online] 2003; 4:artículo 71. Disponible en: URL: <http://www.pharmscitech.com>.

89. Langer R, Cleland JL, Hanes J. New stability in controlled-release systems. *Nat Biotechnol* (2000); 18:24-5.

90. Fu K, Klivanov AM, Langer R. Protein stability in controlled-release systems. *Nat Biotechnol* (2000); 18:24-5.

91. Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv Drug Deliv Rev* (2005); 57:391-410.

Recibido en marzo de 2007. Aprobado en abril de 2007.