

4. Nanosistemas lipídicos

DOLORES TORRES Y BEGOÑA SEIJO

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

LIPOSOMAS

INTRODUCCIÓN: PERSPECTIVA GENERAL

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



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

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

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

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

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

NOMENCLATURA UTILIZADA EN *LIPOSOMOLOGÍA*

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

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

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

MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TIPOS DE LIPOSOMAS

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

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

Liposomas convencionales

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

Liposomas de circulación prolongada (Stealth liposomes)

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

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

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

Liposomas catiónicos

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

Inmunoliposomas

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

APLICACIONES EN MEDICINA

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

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

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

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

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

NANOSISTEMAS LIPÍDICOS

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

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

Liposomas en infecciones

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

Antifúngicos

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

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

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

Antibióticos y antivirales

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

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

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

Liposomas en artritis reumatoide

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

Liposomas en enfermedades respiratorias

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Liposomas en enfermedades oculares

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

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

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

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

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

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

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

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

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

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

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

Junto con estas ventajosas características, las nanopartículas lipídicas poseen también ciertas limitaciones, como por ejemplo, la baja capacidad de encapsulación de un determinado número de moléculas y la posible expulsión de las mismas durante el almacenamiento. El hecho de que los lípidos, especialmente los más purificados, cristalicen en una perfecta estructura cristalina, es lo que hace que quede poco espacio para alojar a las moléculas de fármaco. Además, tras su producción, las nanopartículas lipídicas cristalizan en estados altamente energéticos, como α y β . Durante el almacenamiento, las moléculas lipídicas experimentan un proceso de reestructuración, dando lugar a estados de baja energía β i y β . Por lo tanto, cuanto más perfecta es la estructura cristalina, mayor tendencia habrá a la expulsión del fármaco (74).

Para superar estas limitaciones, se han desarrollado un nuevo tipo de nanosistemas: los portadores lipídicos nanoestructurados (75). El fundamento de estos nuevos sistemas es la creación de una matriz lipídica lo más imperfecta posible. Ello se consigue mezclando lípidos sólidos y líquidos que forman partículas que poseen una mayor capacidad de carga y minimizan la expulsión del fármaco durante el almacenamiento. Frecuentemente, son mezclas de los lípidos sólidos citados anteriormente con el aceite Migliol 812[®], constituido por triglicéridos de cadena media derivados del ác. cáprico y caprílico.

Metodología de producción de nanopartículas lipídicas

Las técnicas principales de preparación son la homogeneización a alta presión, la preparación vía microemulsión y la técnica de emulsión-evaporación del disolvente.

Técnica de Homogeneización a alta presión

Esta técnica de preparación ha sido desarrollada por Müller y Luks (60). En el procedimiento clásico, *homogeneización en caliente*, el lípido fundido conteniendo el principio activo, se emulsifica en una solución acuosa que incluye el agente tensoactivo, y se encuentra a la misma temperatura que el lípido, mediante agitación a elevada velocidad o ultrasonidos. A continuación, la preemulsión se somete a homogeneización a alta presión. Como condiciones típicas de producción, se repiten 500 bares de presión, y entre 3-5 ciclos de homogeneización. Finalmente, la nanoemulsión se enfría, la fase lipídica se solidifica, y se forma la suspensión de nanopartículas lipídicas.

Esta técnica está especialmente dirigida a la encapsulación de moléculas lipofílicas, ya que las hidrofílicas difunden en gran proporción a la fase acuosa durante la fase de homogeneización, dando lugar a un baja eficacia de encapsulación. Uno de los inconvenientes que presenta esta tecnología es la exposición de los principios activos a altas temperaturas, aunque durante un tiempo muy corto, lo que permite que compuestos sensibles a la temperatura puedan resistir el proceso.

Para la encapsulación de fármacos hidrofílicos, se diseñó un procedimiento denominado de *homogeneización en frío*, en el que el lípido fundido se enfría de manera rápida en hielo seco o nitrógeno líquido. De esta manera se incrementa la fragilidad del lípido, para facilitar el proceso posterior de molienda en mortero o mortero de bolas, destinado a obtener micropartículas de 50-100 μm . Estas micropartículas se dispersan en una solución fría del tensoactivo y, finalmente, la suspensión se somete a homogeneización a alta presión a temperatura ambiente, o por debajo de ésta (76).

Técnica de Preparación vía microemulsión

Este método (59) se fundamenta en el mecanismo básico de las microemulsiones, a las que se transforma en una nanoemulsión ultrafina tras la ruptura de las mismas por adición, por ejemplo, de un determinado volumen de agua.

En la formación de la microemulsión, el lípido se funde, y en él se disuelve el fármaco. A continuación se añaden a alta temperatura, el tensoactivo, co-tensoactivo y agua para formar la microemulsión, que se vierte sobre agua fría, rompiéndose en nanogotículas de emulsión, que cristalizan para formar las nanopartículas lipídicas.

Como inconvenientes de este procedimiento, podemos señalar la alta concentración de tensoactivos y cotensoactivos que se requiere, como por ejemplo el butanol, muy poco deseable desde el punto de vista regulatorio; la utilización de disolventes para formar la microemulsión y la elevada dilución a la que se someten finalmente las partículas, que da lugar a que el contenido final en partículas se sitúe habitualmente por debajo del 1%.

Técnica de Emulsificación- evaporación del disolvente

Este método, ampliamente utilizado en la preparación de micro y nanopartículas poliméricas, fue aplicado por primera vez en la preparación de nanopartículas lipídicas por Sjöström y Bergensahl (77). El material lipídico, en este caso, se disuelve en un disolvente orgánico inmiscible en agua, como el diclorometano, en el que se solubiliza también el principio activo. Esta fase orgánica se emulsifica en una fase acuosa que contiene el agente tensoactivo, mediante agitación mecánica o sonda de ultrasonidos. Tras la evaporación del disolvente bajo agitación, o presión reducida, se forma la dispersión de nanopartículas tras la precipitación del lípido.

La utilización de una doble emulsión w/o/w en esta técnica, ha permitido la encapsulación de antígenos (78) o péptidos como la calcitonina y la insulina (63, 79).

Técnica de Emulsificación-difusión del disolvente

Esta técnica comparte similitudes con la anterior, diferenciándose únicamente en el método de precipitación del lípido a partir de la emulsión. En este caso se consigue añadiendo un volumen extra de agua a la fase acuosa, lo que provoca la difusión inmediata del disolvente orgánico, con la consecuente precipitación del lípido. Trotta y col. (80), utilizaron esta técnica para encapsular el péptido insulina, consiguiendo eficacias de encapsulación del 80%.

Una técnica muy similar, la de desplazamiento del disolvente, en la que simplemente no se parte de una emulsión, sino que el disolvente miscible con agua difunde rápidamente a la fase acuosa, fue utilizada con éxito para preparar nanopartículas lipídicas conteniendo gonadorelina (81).

Aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas lipídicas

Administración endovenosa

La administración endovenosa de nanopartículas lipídicas ha sido estudiada con distintas finalidades: las más importantes, la vehiculización de antitumorales a la diana tumoral (65, 66) y la vehiculización de fármacos a cerebro (82), como trataremos más adelante (apartados a y b). De un modo general, distintos estudios han evaluado la alteración del comportamiento farmacocinético de determinadas moléculas tras ser administradas por vía endovenosa incluidas en nanopartículas lipídicas. Así se ha podido comprobar que simplemente tras la inclusión en nanopartículas lipídicas de antitumorales como la camptotecina (83) o la doxorubicina (84, 86), su área bajo la curva (AUC) se veía incrementada entre 3 y 20 veces, en comparación a la solución del fármaco. Las semividas de eliminación también experimentaron un aumento considerable, aun sin tratarse de sistemas de permanencia prolongada, ya que en la mayor parte de los nanosistemas era la lecitina el único estabilizante empleado.

En estos estudios llevados a cabo con la doxorubicina (85, 86), se demostró igualmente que la distribución del fármacos a corazón disminuía, cuando se encontraba incluido en nanopartículas, hecho de particular importancia al tratarse de un fármaco cuya cardiotoxicidad es una de sus principales limitaciones.

El recubrimiento con PEG-2000 mejoró la capacidad de las nanopartículas de evitar el aclaramiento por parte del sistema retículo endotelial (83, 85), dando lugar a mayores incrementos en el AUC y en la semivida de eliminación. Es de destacar la clara relación existente entre el porcentaje de PEG incorporado en las nanopartículas y el incremento en el AUC, o en la semivida de eliminación logrados (83). Así, la incorporación de un 0.15, 0.30 y 0.45% de estearato de PEG 2000, con respecto a la microemulsión lipídica, dio lugar a valores crecientes de AUC de doxorubicina (260, 318 y 433 $\mu\text{g ml}^{-1} \text{ min}$).

Las nanopartículas lipídicas en la terapia antitumoral

Targeting tumoral

Los estudios de biodistribución de antitumorales en nanopartículas lipídicas llevados a cabo hasta el momento hacen que éstas puedan considerarse ventajosas desde un punto de vista terapéutico (83, 86). Sin embargo, la mayoría de ellos se realizaron en animales sanos, y no en animales con tumores. Por lo tan-

to, el hecho de que las nanopartículas puedan incrementar la concentración de fármaco en el tumor, debido a una mayor permeabilidad y retención por parte del tumor (efecto EPR), no está todavía muy demostrado. A este respecto, son muy prometedores los resultados obtenidos por Reddy y col. (87) en un reciente estudio llevado a cabo en ratones a los que se había implantado un linfoma tipo Dalton. En él, se comparó la biodistribución de etopósido marcado con tecnecio⁹⁹ libre o incluido en nanopartículas lipídicas, comprobándose que, tras su administración i.v., la concentración del radiofármaco se incrementaba un 67% al cabo de 1 hora, y un 30% tras 24 horas postinyección. Curiosamente, las concentraciones fueron aun mayores, cuando las nanopartículas se inyectaron subcutánea o intraperitonealmente, probablemente debido a la lenta y progresiva difusión desde el lugar de inyección.

Eficacia antitumoral

Con respecto a la eficacia antitumoral, la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo *in vitro* en cultivos celulares, llegando en algún caso a la administración *in vivo* en ratones desnudos a los que se había implantado un determinado tumor. Destaca un estudio llevado a cabo por Serpe y col. (88) en el que se evaluó la citotoxicidad de formulaciones de nanopartículas lipídicas conteniendo butirato de colesterilo, doxorubicina o paclitaxel, sobre la línea de cáncer colorectal HT-29. Frente a estos dos últimos fármacos, considerados citostáticos ya clásicos en la terapia antitumoral, el butirato de colesterilo es un nuevo agente identificado para el tratamiento del cáncer. Tanto el butirato de colesterilo como la doxorubicina, incluidos en nanopartículas, mostraron valores de IC_{50} (concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular) considerablemente inferiores a los correspondientes de las soluciones convencionales del fármaco libre. En el caso del paclitaxel, no se observaron diferencias entre los valores de IC_{50} , correspondientes a la formulación de nanopartículas y a la solución del fármaco, sin embargo, cabe destacar el hecho de que en el caso de las nanopartículas lipídicas, la citotoxicidad se debe únicamente al fármaco formulado en dichos vehículos, mientras que en la formulación clásica de paclitaxel, es el diluyente (Cremophor EL) en parte el responsable del efecto citotóxico.

Se ha evaluado igualmente el efecto de nanopartículas lipídicas conteniendo doxorubicina sobre líneas tumorales resistentes a fármacos, como es el caso de las líneas de cáncer de mama murino EMT6/AR1 y humano MDA435/LCC6/MDR1, que sobreexpresan glicoproteína-P (89, 90). En este caso, las nanopartículas, de-

nominadas *híbridas* por estar constituidas por un lípido (ac. esteárico) y un polímero (derivado del aceite de soja), demostraron una mayor captura y retención de doxorubicina por parte de las células resistentes, llegando a ser 8 veces más eficaces que la doxorubicina en solución al inhibir el crecimiento de las células tumorales. Estos resultados confirmaron la capacidad de penetración de las nanopartículas lipídicas en las células tumorales, salvando los mecanismos de multiresistencia celulares. Finalmente, estos sistemas híbridos se evaluaron *in vivo*, tras inyección tumoral en ratones a los que se había implantado el tumor sólido EMT6, procedente de carcinoma de mama (91). Se pudo apreciar un retraso significativo en el crecimiento del tumor, así como la aparición de necrosis tumorales con mínima toxicidad sistémica.

Llama la atención en este estudio, sin embargo, la ausencia de un control tan imprescindible para valorar la trascendencia de los resultados, como es la administración del fármaco en solución.

Las nanopartículas lipídicas y su acceso al Sistema Nervioso Central

En los años 90, las nanopartículas lipídicas se propusieron como vehículos para la liberación de fármacos a cerebro, de manera independiente por dos grupos de investigación diferentes (83, 84), aunque realmente la primera prueba del transporte de partículas lipídicas a través de la barrera sangre-cerebro, había aparecido con anterioridad (92). Concretamente, fue al estudiar la farmacocinética de dos antitumorales, la camptotecina y la doxorubicina, cuando se observó acumulación de los fármacos en cerebro, tanto tras administración oral como i.v. cuando se incluyeron en nanopartículas.

Como ya se demostró para otro tipo de partículas como las de policianoacrilato de alquilo, cuando la superficie de las partículas se modificó con derivados del PEG, o tensoactivos que contenían PEG, el acceso a cerebro mejoró notablemente (83, 86, 93). Igualmente, la modificación de la carga superficial produjo cambios en la distribución a cerebro (94). Así, se comprobó que nanopartículas de tripalmitina conteniendo etopósido y cargadas positivamente (+5 mV; 391 nm), mostraban una mayor acumulación en cerebro que las de carga negativa (-47 mV; 362 nm). También, cuando se compararon nanopartículas de tripalmitina conteniendo clozapina se observó un AUC superior, y una mayor distribución a cerebro cuando estaban recubiertas de estearilamina (+23.2 mV), en comparación a las no recubiertas (+ 0.2 mV) (95). Sin embargo, la mayor penetración cerebral de las nanopartículas cargadas positivamente, podría estar relacionada con una mayor toxicidad, como así se puede desprender de un es-

tudio de perfusión *in situ* en cerebro de ratas en el que la alteración de la integridad de la barrera hematoencefálica es comparativamente más acusada para las partículas positivas (96).

Administración oral

Las nanopartículas lipídicas son especialmente interesantes para su utilización por vía oral, por diferentes motivos. En primer lugar, por las propiedades mucoadhesivas que presentan debido a su naturaleza coloidal, y a las que se atribuye el hecho de facilitar la liberación del fármaco en la zona del intestino a la que se adhieren. Por otra parte, existe la posibilidad de que sean internalizadas por las células intestinales, y además, hay que tener en cuenta que los lípidos constituyentes de las mismas tengan un efecto promotor de la absorción.

La capacidad promotora de la absorción de los lípidos, ha sido explicada de manera específica en los estudios de W. Charman y col. (97, 98). Así, los lípidos serían degradados por enzimas digestivos, convirtiéndose en mono y diglicéridos, que se soltarían formando micelas. En estas micelas se incorporaría el fármaco, y tras interactuar con las sales biliares, se formarían las denominadas *micelas mixtas*, a través de las cuales se facilitaría la absorción del fármaco.

Se ha demostrado, además, la influencia de la estructura sobre la potencia promotora de los lípidos. Así, los triglicéridos de cadena larga son más efectivos que los de cadena media al promover la absorción de fármacos como la halofantrina (99). También la longitud de la cadena del ácido graso afecta al tipo de absorción que pueda tener lugar. Es interesante también el hecho de que se haya demostrado la captura linfática de nanopartículas lipídicas, tras su administración intraduodenal (100).

Se han llevado a cabo estudios *in vivo* con nanopartículas lipídicas administradas por vía oral conteniendo tobramicina (101, 102), clozapina (95), rifampicina, isoniazida y pirazinamida (103), camptotecina (104), en los que se ha demostrado que los vehículos lipídicos son capaces de mejorar tanto la biodisponibilidad como las propiedades farmacocinéticas de éstas moléculas.

También en el caso de la administración oral de moléculas peptídicas se han obtenido interesantes resultados. Así, nuestro grupo ha diseñado para tal fin nanopartículas lipídicas recubiertas con polímeros hidrofílicos como el PEG o el quitosano (63, 105, 106) (Figura 4.2), demostrando que ambas eran captadas de un modo similar por parte de células Caco-2. Cuando estas nanopartículas conteniendo calcitonina, se administraron por vía oral a ratas, las nanopartículas re-

cubiertas de quitosano lograron un marcado y prolongado efecto hipocalcémico, que no apareció sin embargo tras la administración de las recubiertas de PEG (105, 106) (Figura 4.3). La probable explicación de este efecto ha de relacionarse tanto con la mucoadhesión del quitosano como con la apertura de las uniones intercelulares que el quitosano promueve.

Administración pulmonar

Una de las vías exploradas para las nanopartículas lipídicas ha sido la pulmonar. Concretamente, se ha estudiado su distribución tras ser aerosolizadas a

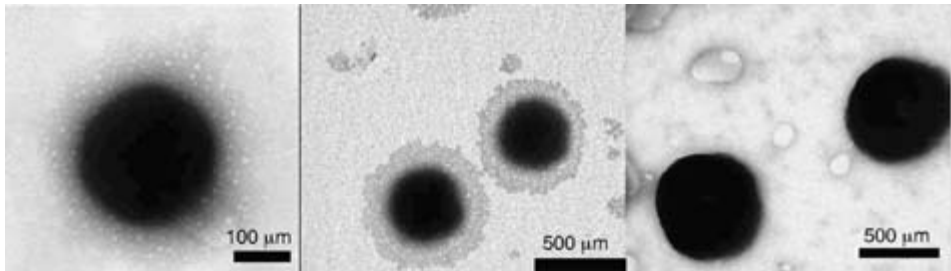


FIGURA 4.2. Fotografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de tripalmitina recubiertas de PEG (izquierda), nanopartículas de tripalmitina/Miglyol® 812 recubiertas de PEG (medio) y nanopartículas de tripalmitina recubiertas de quitosano (derecha) (Tomado de ref. 105).

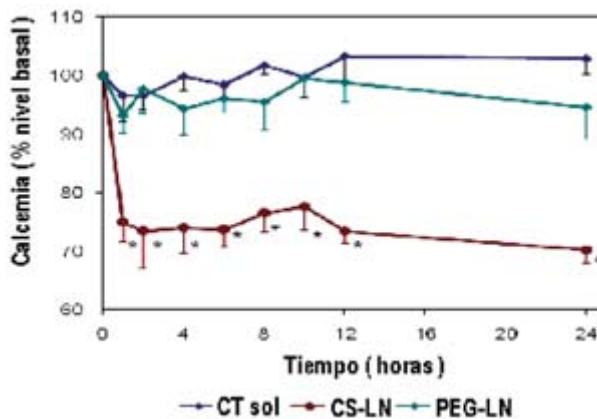


FIGURA 4.3. Niveles de calcemia en suero obtenidos tras la administración intragástrica de una solución de calcitonina (CT Sol), de nanopartículas de tripalmitina conteniendo calcitonina recubiertas de de quitosano (CS-LN) o de PEG (PEG-LN) (media \pm e.e., $n = 6$); *diferencias significativas al comparar CS-LN con CT Sol o con PEG-LN, $\cdot\alpha < 0.05$ (Tomado de ref. 105).

ratas mediante un nebulizador ultrasónico, o bien administradas por vía intra-traqueal (72, 107). Las nanopartículas, marcadas con ^{99m}Tc fueron seguidas mediante gammagrafía, comprobándose su rápido acceso a nódulos linfáticos regionales, y sugiriéndose la fagocitosis por macrófagos alveolares como el mecanismo más probable de captura. La acumulación observada en nódulos linfáticos también ha hecho que las nanopartículas lipídicas sean propuestas como vehículos terapéuticos tras su liberación pulmonar.

Administración cutánea y transdérmica

En los últimos años, se han comercializado algunos productos de aplicación en cosmética, basados en las nanopartículas lipídicas (108). De hecho, de los denominados portadores lipídicos nanoestructurados, considerados como la segunda generación de nanopartículas lipídicas, se encuentran en el mercado mundial más de 20 productos relacionados con la cosmética.

Considerando que para los liposomas, éste fue también el primer paso previo a su entrada en el mercado farmacéutico para otras aplicaciones terapéuticas, la situación puede ser prometedora para las nanopartículas lipídicas. Se ha comprobado además, mediante nanopartículas fluorescentes, que éstas pueden penetrar en la piel, especialmente a través del espacio que rodea al folículo piloso, lo que ofrece grandes expectativas para el tratamiento del acné o patologías como la alopecia (70).

Recientemente se ha estudiado la posibilidad de que las nanopartículas lipídicas actúen como sistemas transdérmicos para moléculas como la melatonina (71). Los resultados demostraron la existencia de absorción significativa para dicha hormona cuando era aplicada tras su incorporación a nanopartículas lipídicas, que además conseguían mantener niveles significativos durante un período de 24 horas.

Administración ocular

Es una vía todavía poco explorada para la administración de nanopartículas lipídicas, pero sin embargo el estudio realizado por el grupo de Gasco y col. (73) con tobramicina tópica crea nuevas expectativas en este área. Destaca especialmente tanto el notable incremento observado en el AUC de las concentraciones de fármaco en humor acuoso, que se multiplicó por un factor de 4, así como en el $t_{\text{máx}}$, que se multiplicó por 8, en comparación a la administración del colirio comercial. El seguimiento de estas nanopartículas marcadas con fluo-

rescencia explica los buenos resultados obtenidos, ya que tanto la retención a nivel precorneal como a nivel del saco conjuntival se prolonga notablemente, lo que es crucial en este tipo de administración.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bangham, A.D., Standish, M.M. & Watkins, J.C. (1965) Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13: 238-252.
- (2) Perrie, Y. (2008) Gregory Gregoriadis: Introducing liposomes to drug delivery. *J. Drug Targ.* 16: 518-519.
- (3) Fenske, D.B., Chonn, A. & Cullis, P.R. (2008) Liposomes as Nanomedicines : an emerging field. *Toxicologic Pathology.* 36: 21-29.
- (4) Ehrlich, P. (1906) Collected studies on Immunology. John Wiley, New York, pp 442-447.
- (5) Takeuchi, H., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H. & Kawashima, Y. (2005) Effectiveness of submicron-sized chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. *Int. J. Pharm.* 303: 160-170.
- (6) Wu, Z.H., Ping, Q.N., Wei, Y. & Lai, J.M. (2004) Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice. *Acta Pharmacol. Sin.* 25: 966-972.
- (7) Maurer, N., Fenske, D.B. & Cullis, P.R. (2001) Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1: 923-947.
- (8) Simard, P., Leroux, J.C., Allen, C. & Meyer, O. (2007) Liposomes for drug delivery. En *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*. Domb AJ, Tabata Y, Ravi Kumar MNV (eds). American Scientific Publishers, Stevenson Ranch California, pp 1-62.
- (9) El Magharaby, G.M., Barry, B.W. & Williams, A.C. (2008) Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34: 203-222.
- (10) Cevc, G. (1996) Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration and transdermal drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 13: 257-388.
- (11) Azarmi, S., Roa, W.H. & Lobenberg, R. (2008) Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 863-875.
- (12) Lian, T. & Ho, R. (2001) Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 90: 667-680.
- (13) Saunders, L., Perrin, J. & Gammack, D.B. (1962) Ultrasonic irradiation of some phospholipid solutions. *J. Pharm. Pharmacol.* 14: 576-572.

- (14) Kremer, J.M.H., Van de Esker, M.W.J., Pathmamanoharan, C. & Wiersema, P.H. (1977) Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry*. 16: 3932-35.
- (15) Szoka, F. & Papahadjopoulos, D. (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467-508.
- (16) Szoka, F., Olson, F., Heath, T., Vail, W., Mayhew, E. & Papahadjopoulos, D. (1980) Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 microns) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 601: 559-571.
- (17) Talsma, H., Ozer, A.Y., Van Bloois, L. & Crommelin, D.J. (1989) The size reduction of liposome with a high pressure homogenizer (Microfluidizer): characterization of prepared dispersions and comparison with conventional methods. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15: 197-207.
- (18) Kirby, C. & Gregoriadis, G. (1984) Dehydration-rehydration vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology*. 2: 979-984.
- (19) Li, C. & Deng, Y. (2004) A novel method for the preparation of liposomes: freeze drying of monophasic solutions. *J. Pharm. Sci.* 93: 1403-1414.
- (20) Storm, G. & Crommelin, D.J.A. (1998) Liposomes: quo vadis? *Pharm. Sci. Technol. Today*. 1: 19-31.
- (21) Klibanov, A.L., Maruyama, K., Beckerleg, A.M., Torchilin, V.P. & Huang, L. (1990) Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong circulation time in liposomes. *FEBS Lett.* 268: 235-237.
- (22) Senior, J., Delgado, C., Fisher, D., Tilcock, C. & Gregoriadis, G. (1991) Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma proteins and clearance from the circulation: studies with polyethyleneglycol-coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1062: 77-82.
- (23) Immordino, M.L., Dosio, F. & Cattel, L. (2006) Stealth liposomes: review of the basic science, rationale and clinical applications; existing and potential. *Int. J. Nanomed.* 1: 297-315.
- (24) Torchilin, V.P., Trubetskoy, V.S., Whitemen, K.R., Calceti, P., Feruti, P. & Veronese, F.M. (1995) New synthetic amphiphilic polymers for the steric protection of liposomes in vivo. *J. Pharm. Sci.* 84: 1049-1053.
- (25) Lasic, D.D. & Templeton, N.S. (1996) Liposomes in gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 20: 221-266.
- (26) Torchilin, V.P. (2006) Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8: 343-375.

- (27) Schnyder, A., Krahenbuhl, S., Torok, M., Drewe, J. & Huwyler, J. (2004) Targeting of skeletal muscle in vitro using biotinylated immunoliposomes. *Biochim. J.* 377: 61-67.
- (28) Portney, N.G. & Ozkan, M. (2006) Nano-oncology: drug delivery, imaging and sensing. *Annal. Bioanal. Chem.* 384: 620-630.
- (29) Torchilin, V.P. (2005) Recent advances with lipomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discovery.* 4: 145-160.
- (30) Allen, T.M. & Cullis, P.R. 2004. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science.* 303: 1818-1822.
- (31) Andresen, T.L., Jensen, S.S. & Jorgensen, K. (2005) Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospect of active and tumor specific drug release. *Prog. Lipid Res.* 44: 68-97.
- (32) Torrado, J.J., Espada, R., Ballesteros, M.P. & Torrado-Santiago, S. (2008) Amphotericin B formulations and drug targeting. *J. Pharm. Sci.* 97: 2405-2425.
- (33) Walsh, T.J., Yeldandi, M., McEvoy, M., Gonzalez, C., Chanock, S., Freijeld, A., Seibel, N.I., Whitcomb, P.O., Jarosinski, P., Boswell, G., Bekersky, I., Alak, A., Buell, D., Barret, J. & Wilson, W. (1998) Safety, tolerance and pharmacokinetics of small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (Ambisome) in neutropenic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2391-2398.
- (34) Désormaux, A. & Bergeron, M.G. (2005) Lymphoid tissue targeting of anti-HIV drugs using liposomes. *Methods Enzymol.* 391: 330-351.
- (35) Gagné, J.F., Désormaux, A., Perron, S., Tremblay, M.J. & Bergeron, M.G. (2002) Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1558: 198-210.
- (36) Feldmann, M., Brennan, F.M. & Maini, R.N. (1996) Rheumatoid Arthritis. *Cell.* 85: 307-310.
- (37) Tran, C.N., Lundy, S.K. & Fox, D.A. (2005) Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology.* 12: 183-189.
- (38) Vanniasinghe, A.S., Bender, V. & Manolios, N. The potential of liposomes drug delivery for the treatment of inflammatory arthritis. *Sem. Arthrit. Reuma.* En prensa. doi: 10.1016/j.semarthrit.2008.08.004.
- (39) Lee, L., Buckley, C., Blades, M.C., Panay, G., George, A.J. & Pitzalis, C. (2002) Identification of synovium-specific homing peptides in vivo phage display section. *Arthritis Rheum.* 46: 2109-2120.
- (40) Gaspar, M.M., Bakowsky, U. & Ehrhardt, C. (2008) Inhaled liposomes. Current strategies and future challenges. *J. Biomed. Nanotechnol.* 4: 1-13.

- (41) Zaru, M., Mourtas, S., Klepetsanis, A., Fadda, A.M. & Antimisiaris, S.G. (2007) Liposomes for drug delivery to the lung by nebulization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67: 655-666.
- (42) Bridges, P.A. & Taylor, K.M. (1998) Nebulisers for the generation of liposomal aerosols. *Int. J. Pharm.* 173: 117-125.
- (43) Wong, J.P., Yang, H.M., Blasetti, K.L., Schnell, G., Conley, J. & Schofield, L.N. (2003) Liposome delivery of ciprofloxacin against intracellular *Francisella tularensis* infection. *J. Control. Release.* 92: 265-273.
- (44) Clark, J.M., Whitney, R.R., Olsen, S.J., George, R.J., Swerdel, L., Kunselman, L. & Bonner, D.P. (1991) Amphotericin-B lipid complex therapy of experimental fungal-infections in mice. *Antimicrobial Agents Chemother.* 35: 615-621.
- (45) Leemans, J.C., Juffermans, N.P., Florquin, S., Van Rooijen, N., Vervoordeldonk, M.J., Verbon, A., Van Derenter, S.J.H. & Van der Poll, T. (2001) Depletion of Alveolar Macrophages Exerts Protective Effects in Pulmonary Tuberculosis in Mice. *J. Immunol.* 166: 4604-4611.
- (46) Chono, S., Tanino, T., Seki, T. & Morimoto, K. (2007) Uptake characteristics of liposomes by rat alveolar macrophages: influence of particle size and surface mannose modification. *J. Pharm. Pharmacol.* 59: 75-80.
- (47) Khanna, C., Hasz, D.E., Klausner, J.S. & Anderson, P.M. (1996) Aerosol delivery of interleukin-2 liposomes is non toxic and biologically effective: canine studies. *Clin. Cancer Res.* 2: 721-734.
- (48) Khanna, C., Anderson, P.M., Hasz, D.E., Katsanis, E., Neville, M. & Klausner, J.S. (1997) Interleukin2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases. *Cancer.* 79: 1409-1421.
- (49) Verschraegen, C.F., Gilbert, B.E., Loyer, E., Huaranga, A., Walsh, G., Newman, R.A. & Knight, V. (2004) Clinical evaluation of the delivery and safety of aerosolized liposomal 9-nitro-20(S)-camptothecin in patients with advanced pulmonary malignancies. *Clin. Cancer Res.* 10: 2319-2326.
- (50) Laube, B.L. (2005) The expanding role of aerosols in systemic drug delivery, gene therapy and vaccination. *Respir. Care.* 50: 1161-1176.
- (51) Huang, Y.Y. & Wang, C.H. (2006) Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. *J. Control Release.* 113: 9-14.
- (52) Kaur, I.P., Garg, A., Singla, A.K. & Aggarwal, D. (2004) Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *Int. J. Pharm.* 269: 1-14
- (53) Reddy, I.K. & Ganesan, M.G. (1996) Ocular therapeutics and drug delivery: a multidisciplinary approach. Technomic Publishing Company.

- (54) Sanchez, A. & Alonso, M.J. (2006) Nanoparticulate carriers for ocular drug delivery. En: Nanoparticulates as drug carriers. Wei K (ed). World Scientific Imperial College Press.
- (55) Al-Muhammed, J., Ozer, A.Y., Ercan, M.T. & Hinkal, A.A. (1996) In vivo studies on dexamethasone sodium phosphate liposomes. *J. Microencapsul.* 13: 293-306.
- (56) Ebrain, S., Peyman, G.A. & Lee, P.J. (2005) Applications of liposomes in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.* 50: 167-182.
- (57) Dean, D.A., Byrd, J.N. & Dean, B.S. (1999) Nuclear targeting of plasmid DNA in human corneal cells. *Curr. Eye Res.* 19: 66-75.
- (58) Bochot, A., Couvreur, P. & Fattal, E. (2000) Intravitreal administration of anti-sense oligonucleotides: potential of liposomal delivery. *Prog. Retin. Eye Res.* 19: 131-147.
- (59) Gasco, M.R. (1993) Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. U.S. Patent No 5.250.236.
- (60) Müller, R.H. & Lucks, J.S. (1996) Arneistoffträger aus festen lipidteilchen, feste lipidnanosphären (SLN)/ Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN). European Patent EP 0605497 B1.
- (61) Gasco, M.R. (2007) Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 377-378.
- (62) Manjunath, K., Reddy, J.S. & Venkateswarlu, V. (2005) Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 27: 127-144.
- (63) García-Fuentes, M., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. *Int. J. Pharm.* 296: 122-132.
- (64) Wissing, S.A., Kaiser, O. & Müller, R.H. (2004) Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56: 131-155.
- (65) Shenoy, V.S., Vijay, I.K. & Murthy, R.S.R. (2005) Tumor targeting: biological factors and formulations advances in injectable lipid nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* 57: 127-144.
- (66) Wong, H.L., Bendayan R., Rauthm A.M., Lim Y. & Wu, X.Y. (2007) Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 491-504.
- (67) Hu, L., Tang, X. & Cui, F. (2004) Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 56: 1527-1535.
- (68) Muchow, M., Maincent, P. & Müller, R.H. (2008) Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN[®], NLC[®], LDC[®]) for oral drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34: 1394-1405.

- (69) Müller, R.H., Radtke, M. & Wissing, S.A. (2002) Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 131-155.
- (70) Wissing, S. & Müller, R.H. (2002) Solid lipid nanoparticles as carriers for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J. Control. Rel.* 81: 225-233.
- (71) Priano, L., Esposti, D., Esposti, R., Castagna, G., De Medici, C., Fraschini, F. & Gasco, M.R. (2007) Solid lipid nanoparticles incorporating melatonin as new model for sustained oral and transdermal delivery systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7: 1-6.
- (72) Videira, M.A., Botelho, M.F., Santos, A.C., Gouveia, L.F., Pedrosa de Lima, J.J. & Almeida, A.J. (2002) Pulmonary delivery of SLN as a colloidal drug carrier system to the lung lymphatics. *J. Drug Target.* 10: 607-613.
- (73) Cavalli, R., Gasco, M.R., Chetoni, P., Burgalassi, S. & Saettone, M.F. (2002) Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int. J. Pharm.* 238: 241-245.
- (74) Westensen, K., Bunjes, H. & Koch, M.H.J. (1997) Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J. Control Rel.* 48: 223-236.
- (75) Müller R.H., Mäder K., Lippacher A. & Jenning V. (2000) Fest-flüssige (halbfeste) Lipidpartikel und Verfahren zur Herstellung hochkonzentrierter Lipidpartikel-dispersionen. PCT application PCT/EP00/04565.
- (76) Müller R.H., Mehnert W., Lucks J.S., Schwarz J.S., zur Mühlen, A., Weyhers, H., Freitas, C. & Rühl, D. (1995) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41: 62-69.
- (77) Sjöström, B. & Bergenstahl (1992) Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions, I. Model studies of the precipitation of cholesterol acetate. *Int. J. Pharm.* 88: 53-62.
- (78) Saraf, S., Mishra, D., Asthana, A., Jain, R., Singh, S. & Jain, N.K. (2006) Lipid nanoparticles for mucosal immunization against hepatitis B. *Vaccine.* 24: 45-56.
- (79) García-Fuentes, M., Torres, D. & Alonso, M.J. (2002) Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Coll. Surf. B. Biointerf.* 27: 159-168.
- (80) Trotta, M., Cavalli, R., Carlotti, M.E., Battaglia, L. & Debernardi, F. (2005) Solid lipid micro-particles carrying insulin formed by solvent-in-water emulsion-diffusion technique. *Int. J. Pharm.* 288: 281-288.
- (81) Hu, F.Q., Hong, Y. & Yuan, H. (2004) Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *Int. J. Pharm.* 273: 29-35.

- (82) Blasi, P., Giovagnoli, S., Schoubben, A., Ricci, M. & Rossi, C. (2007) Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 454-477.
- (83) Yang, S.C., Lu, L.F., Cai, Y., Zhu, J.B., Liang, B.W. & Yang, C.Z. (1999) Body distribution in mice of intravenously injected M.R. (2002). Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin loaded lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and in other tissues. *J. Drug Target.* 10: 327-335.
- (84) Zara, G.P., Cavalli, R., Fundarò, A., Bargoni, A., Caputo, O. & Gasco, M.R. (1999) Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN). *Pharm. Res.* 40: 281-286.
- (85) Zara, G.P., Cavalli, R., Bargoni, A., Fundarò, A., Vighetto, D. & Gasco, M.R. Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and other tissues. *J. Drug Target.* 10: 327-335.
- (86) Fundarò, A., Cavalli, R., Bargoni, A., Vighetto, D., Zara, G.P. & Gasco, M.R. (2000) Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after IV administration to rats. *Pharm. Res.* 42: 337-343.
- (87) Reddy, L.H., Sharma, R.K., Chuttani, K., Mishra, A.K. & Murthy, R.S.R. (2005) Influence of administration route on tumour uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. *J. Control. Rel.* 105: 185-198.
- (88) Serpe, L., Catalano, M.G., Cavalli, R., Ugazio, E., Bosco, O., Canaparo, R., Muntoni, E., Frairia, R., Gasco, M.R., Eandi, M. & Zara, G.P. (2004) Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58: 673-680.
- (89) Wong, H.L., Rauth, A.M., Bendayan, R., Manias, J.L., Ramaswamy, M., Liu, Z., Erhan, S.Z. & Wu, X.Y. (2006) A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug resistant human breast cancer cells. *Pharm. Res.* 23: 1574-1585.
- (90) Wong, H.L., Bendayan, R., Rauth, A.M., Xue, H.Y., Babakhanian, K. & Wu, X.Y. (2006) A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317: 1372-1381.
- (91) Wong, H.L., Rauth, A.M., Bendayan, R. & Wu, X.Y. (2007) *In vivo* evaluation of a new polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) formulation of doxorubicin in a murine solid tumor model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65: 300-308.

- (92) Minagawa, T., Sakanaka, K., Inaba, S.I., Sai, Y., Tamai, I., Suwa, T. & Tsuji, A. (1996) Blood-brain-barrier transport of lipid microspheres containing clinprost, a prostaglandin 12 analogue. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 1016-1022.
- (93) Podio, V., Zara, G.P., Carazzone, M., Cavalli, R. & Gasco, M.R. (2000) Biodistribution of stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles after intravenous administration to rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 52: 1057-1063.
- (94) Harivardhan, L., Reddy, L.H., Sharma, R.K., Chuttani, K., Mishra, A.K. & Murthy, R.S.R. (2004) Etoposide-incorporated tripalmitin nanoparticles with different surface charge: formulation, characterization, radiolabeling and biodistribution studies. *AAPS J.* 6 (Article 23, [http:// www.aapsj.org](http://www.aapsj.org))
- (95) Manjunath, K. & Venkateswarlu, V. (2005) Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *J. Control Rel.* 107: 215-228.
- (96) Lockman, P.R., Koziara, J.M., Mumper, R.J. & Allen, D.D. (2004) Nanoparticle surface changes alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J. Drug Target.* 12: 635-641.
- (97) Charman, W.N. (2000) Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts. *J. Pharm. Sci.* 89: 967-978.
- (98) Porter, C.J. & Charman, W.N. (2001) Intestinal lymphatic drug transport: An update. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50: 61-80.
- (99) Khoom S.M., Shackelfordm D.M., Porterm C.J., Edwardsm G.A. & Charmanm W.N. (2003) Intestinal lymphatic transport of halofantrine occurs after oral administration of a unit-dose lipid-based formulation to fasted dogs. *Pharm. Res.* 20: 1460-1465.
- (100) Bargoni, A., Cavalli, R., Caputo, O., Fundarò, A., Gasco, M.R. & Zara, G.P. (1998) Solid lipid nanoparticles in lymph and plasma after duodenal administration to rats. *Pharm. Res.* 15: 745-750.
- (101) Cavalli, R., Zara, G.P., Caputo, O., Bargoni, A., Fundarò, A. & Gasco, M.R. (2000) Transmucosal transport of tobramycin incorporated in solid lipid nanoparticles (SLN) after duodenal administration. Part I- a pharmacokinetic study. *Pharmacol. Res.* 42: 541-545.
- (102) Bargoni, A., Cavalli, R., Zara, G.P., Fundarò, A., Caputo, O. & Gasco, M.R. (2001) Transmucosal transport of tobramycin incorporated in solid lipid nanoparticles (SLN) after duodenal administration. Part II- tissue distribution. *Pharmacol. Res.* 43: 497-502.
- (103) Pandey, R., Sharma, S. & Khuller, G.K. (2005) Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis.* 85: 415-420.

- (104) Yang, S.C., Zhu, J.B., Lu, Y., Liang, B.W. & Yang, C.Z. (1999) Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *Pharm. Res.* 16: 751-757.
- (105) García-Fuentes, M. (2004) Nanopartículas lipídicas modificadas con polímeros hidrófilos: desarrollo y evaluación de su potencial como sistemas transportadores de péptidos a nivel intestinal. Universidad de Santiago de Compostela.
- (106) García-Fuentes, M., Prego, C., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethyleneglycol) as carriers for oral calcitonin delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25: 133-143.
- (107) Videira, M., Gano, L., Santos, A.C., Neves, M. & Almeida, A.J. (2006) Lymphatic uptake of lipid nanoparticles following endotracheal administration to rats. *J. Microencapsul.* 23: 855-862.
- (108) Müller, R.H., Rimpler, C., Petersen, R., Hommos, A. & Schwabe, K. (2007) A new dimension in cosmetic products by nanostructured lipid carriers (NLC) technology. *Eur. Cosmet.* 15: 32-37.