

Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica

Jaiver E. Rosas¹ y José L. Pedraz²

¹ Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá D.C. Colombia. Correo electrónico: jerosasp@unal.edu.co

² Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco (UPV-EHU), Paseo de la Universidad n° 7, 01006 Vitoria-Gasteiz, España.

Recibido para evaluación: 14 de marzo de 2007

Aceptado para publicación: 27 de agosto de 2007

RESUMEN

En el campo de la tecnología farmacéutica se presenta actualmente considerable interés en el desarrollo de micropartículas biodegradables como un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad biológica. Son una buena alternativa, teniendo en cuenta que una de las principales desventajas de los productos disponibles es la necesidad de realizar varias administraciones para cumplir totalmente con el tratamiento. Esta contribución examina el papel actual de la microencapsulación de moléculas con actividad antigénica en microesferas elaboradas con polímeros biodegradables derivados de los ácidos láctico y glicólico (PLGA). Aquí se describen las propiedades fisicoquímicas de los biopolímeros empleados, los métodos de obtención de las micropartículas y de algunos de las variables que influyen en las propiedades del producto final. Además, se realiza una breve descripción del modo de acción propuesto para este sistema microparticular.

Palabras clave: PLGA, microesferas, liberación controlada, dosis única.

SUMMARY

PLGA Microspheres: A controlled release system of molecules with immunogenic activity

At the present time, there is a great interest in pharmaceutical technology focused on the development of biodegradable microparticles as a controlled release system of molecules with biological activity. This strategy arises as a good alternative; mainly if it is keep in mind that one of the principal disadvantages of the available products currently is that those products require several administrations to fulfilled

the treatment. Here in is examined the role of microencapsulated antigens into microspheres performed with biodegradable copolymers derived from lactic and glycolic acid (PLGA). Physicochemical properties of biopolymers used, microspheres formulation as well as the parameters that affected the properties of the final product are also described. Additionally, there is a brief review of the action mechanism raised for this microparticular system.

Key words: PLGA, microspheres, controlled release, single dose.

INTRODUCCIÓN

Micropartículas elaboradas con polímeros biodegradables derivados de PLGA (poliláctico-co-glicólico) han sido utilizadas como sistema para la liberación controlada de diversos principios activos (1-8). Hasta hace poco tiempo, se pensó que su utilización estaba limitada a la microencapsulación de moléculas de bajo peso molecular, ya que macromoléculas principalmente de naturaleza proteica probablemente presentarían difusión restringida en estos sistemas y gran sensibilidad a condiciones extremas, tales como contacto directo con solventes orgánicos, agitación mecánica intensa, variaciones de temperatura y proceso de liofilización, entre otras, a las cuales estarían expuestas durante el proceso de microencapsulación.

El desarrollo de nuevos derivados poliméricos y nuevas metodologías para la elaboración de estos sistemas, junto con numerosas técnicas analíticas, han permitido que gran número de grupos de investigación hayan enfocado sus trabajos en esta disciplina, específicamente en la microencapsulación de proteínas y péptidos sintéticos como antígenos (9-13). En este contexto, la microencapsulación y subsiguiente liberación controlada de estas sustancias biológicamente activas se han considerado potenciales ventajas para el desarrollo de la formulación de un inmunógeno para ser administrado en una sola dosis.

POLÍMEROS BIODEGRADABLES

El uso de micropartículas poliméricas para la presentación de antígenos se reportó inicialmente en los años setenta (14), y a finales de esta década se propuso el concepto de liberación controlada de antígenos para inducir la producción prolongada de anticuerpos (15). Estos estudios pioneros motivaron indudablemente las investigaciones sobre biopolímeros y sistemas para la liberación controlada de antígenos. Por tanto, numerosos biopolímeros se han utilizado con este propósito, y en ellos se han obtenido resultados alentadores en lo que se refiere a la inducción de una eficiente respuesta inmunitaria. Algunos de estos estudios, que emplean antígenos modelo, se encuentran en la tabla 1. No obstante la utilización de estos polímeros, actualmente

se admite que los biopolímeros derivados de PLGA son considerados de especial interés para desarrollar sistemas microparticulares para la liberación controlada de antígenos (24-31).

Tabla 1. Polímeros biodegradables utilizados en la elaboración de sistemas de micropartículas para la liberación controlada de antígenos.

Polímero ¹	Antígeno ²	Sistema de liberación ³	Vía de administración ⁴	Referencia
PMMA	V. influenza HIV-1, HIV-2	NP	i.m., s.c.	16,17
Poli(acril)-almidón	HSA	MS	i.v., i.m.	18
Almidón biodegradable	V. influenza	MS	p.o.	19
Gelatina	γ -globulina humana	MS	s.c.	20
RSA	K. pneumoniae	Partículas	i.m.	21
PMMA, PLA, PLGA, EC	SEB	MS	p.o.	22
Poli(butil-2-cianoacrilato)	OVA	NP	p.o.	23

¹ PMMA: polimetilmetacrilato; PLA: Poliláctico; PLGA poli-(láctico-co-glicólico), EC: etilcelulosa, RSA: albúmina sérica de conejo.

² OVA: Ovalbúmina; HSA: Albúmina sérica humana; SEB: Enterotóxina de Staphilococco.

³ NP: nanopartículas; MS: microesferas.

⁴ i.m: intramuscular, s.c: subcutánea; i.v: intravenosa, p.o: oral.

COPOLÍMEROS DE PLGA

Generalidades

Entre los biopolímeros utilizados en el desarrollo de sistemas de micropartículas para la liberación controlada de antígenos destacan los poliésteres alifáticos, formados por unidades monoméricas de ácido láctico y de ácido glicólico (PLGA). Estos biopolímeros están disponibles comercialmente para uso médico y han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral (32). Además, gracias a su biocompatibilidad, han sido ampliamente empleados en numerosas aplicaciones biomédicas, tales

como suturas reabsorbibles e implantes (33, 34). En 1984 se reportó la utilización de microesferas elaboradas con PLGA para la liberación de la hormona luteinizante (35), y posteriormente se propuso la utilización de estos biopolímeros para la elaboración de sistemas de micropartículas para la liberación controlada de antígenos virales y bacterianos (36). Desde entonces, un amplio número de antígenos de diversa naturaleza han sido microencapsulados en microesferas elaboradas con PLA y PLGA, como se observa en la selección de algunos estudios reportados en la tabla 2.

Tabla 2. Estudios de inmunogenicidad empleando microesferas de PLGA y PLA como un sistema para la liberación controlada de antígenos.

Polímero	Antígeno ¹	Especie animal	Vía de administración ²	Referencia
PLGA 50:50 / 75:25	OVA	Ratones	i.g.	37
PLGA 50:50	OVA	Ratones, ratas	i.p., i.g., s.c.	38
PLGA 50:50	BSA	Ratones	s.c. i.g.	11
PLGA 50:50	BSA	Ratones	s.c. i.g. i.n.	31
PLGA 50:50	SPf66	Ratones	s.c. i.g. i.n. i.d.	30
L-PLA	TT	Conejos, ratas	i.n.	39
PLGA 45:55	TT	Ratones	s.c.	40
L-PLA/PLGA 50:50	TT	Ratones	s.c.	9,41
PLGA 50:50 / 75:25	TT	Ratones	s.c.	42
D,L-PLA	TD	Ratones	s.c.	43
PLGA 50:50 / 85:15	SEB	Ratones	i.p., i.g.	44
PLGA 50:50	HIV-1	Cobayo	s.c.	45
PLGA 50:50 / 75:25	Malaria (Ag. sintet.)	Ratones	s.c.	46
L-PLA	Malaria (Ag. recomb)	Ratones	s.c.	47

¹OVA: ovalbumina; TT: toxoide tetánico; TD: toxoide diftérico; SEB: enterotoxina de Staphilococco.

²i.g.: intubación intragástrica; i.p.: intraperitoneal; s.c.: subcutánea; i.n.: intranasal; i.m.: intramuscular, i.d.: intradérmica.

Descripción química

El PLA y el PLGA son compuestos de tipo poliéster, que corresponden respectivamente al homopolímero lineal de D,L-ácido láctico y a copolímeros lineales de D;L-ácido láctico y glicólico, los cuales es posible encontrar en proporciones monoméricas variables.

Estas moléculas pueden ser sintetizadas mediante un proceso de polimerización por condensación de ácido láctico y ácido glicólico a temperatura no inferior a 120°C, o por debajo de esta temperatura en presencia de catalizadores. Mediante este método, solamente es posible obtener polímeros de bajo peso molecular ($PM < 10.000$). Para la obtención de copolímeros de elevado peso molecular, como se describe en la figura 1, es necesario tener como materiales de partida los dímeros cíclicos de los respectivos ácidos, en presencia de catalizadores y condiciones controladas de temperatura y presión (48).

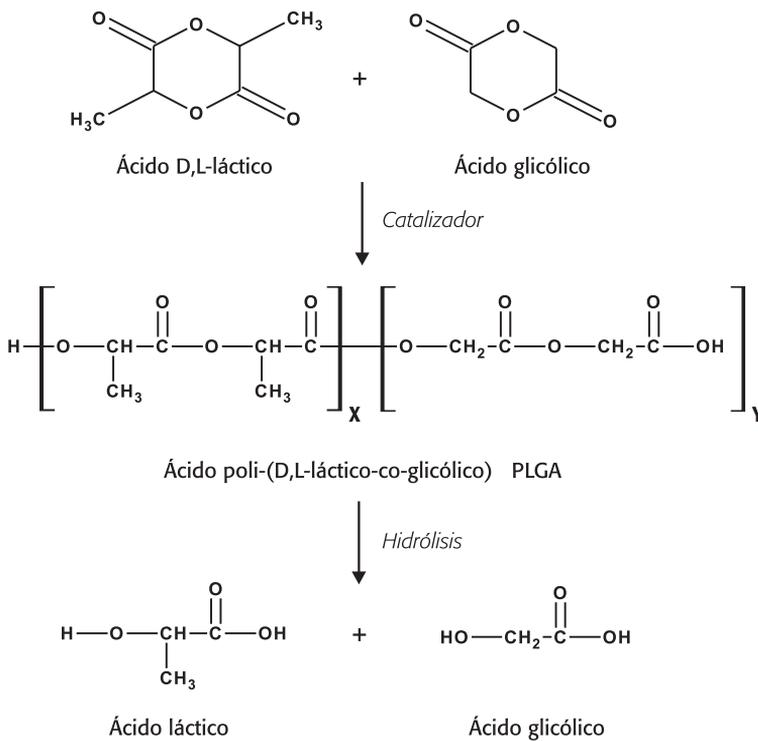


Figura 1. Síntesis e hidrólisis del copolímero poli-(D,L-láctico-co-glicólico), PLGA.

Propiedades fisicoquímicas

Configuración

El PLA contiene una unidad ópticamente activa y existe como isómero L-PLA o como forma racémica D,L-PLA. Mientras que D,L-PLA no es cristalino, el L-PLA tiene la propiedad de formar una fase cristalina o semicristalina, la cual es una propiedad común con el PGA. La cristalinidad es una propiedad que hace a estos biopolímeros un poco menos solubles en solventes orgánicos y también hace que se reduzca su capacidad

para captar agua, y en consecuencia, su velocidad de degradación. Los copolímeros de PLGA generalmente contienen la forma racémica de ácido láctico (49, 50).

Solubilidad

Estos biopolímeros son solubles en gran número de solventes orgánicos e insolubles en soluciones acuosas. En un medio acuoso tienen la capacidad de absorber agua e hincharse, lo cual es una de las propiedades características, según el peso molecular y la composición monomérica (50).

Peso molecular y viscosidad intrínseca

La adición de estos biopolímeros a un solvente le aumenta a éste considerablemente la viscosidad; este parámetro está proporcionalmente relacionado con su peso molecular, el cual a su vez está definido por el grado de polimerización. Los biopolímeros comúnmente utilizados para la elaboración de sistemas de micropartículas para la liberación controlada de antígenos tienen un peso molecular de entre 12.000 y 200.000. Existen biopolímeros de menor peso molecular, pero sus propiedades no son las más adecuadas para este propósito. Entre tanto, biopolímeros con peso molecular demasiado alto dificultan la preparación de estos sistemas (34, 50).

Temperatura de transición vítrea (Tg)

Además de la composición y el peso molecular, la temperatura necesaria para alcanzar el estado vítreo (rígido y frágil) de estos biopolímeros, la cual es conocida como temperatura de transición vítrea (Tg), es una propiedad muy importante que se ha de tener en cuenta en la preparación de las microesferas y esencial para la evaluación de la estabilidad morfológica, propiedades de difusión y velocidad de biodegradación. La Tg tiene relación directa con el peso molecular del biopolímero. La presencia de solventes orgánicos residuales o humedad en estos sistemas puede alterar la Tg en varios grados centígrados y llegar a un valor cercano a la temperatura corporal, lo cual podría afectar la velocidad de degradación de las microesferas y por consiguiente al perfil de liberación del antígeno (34, 50). Además, podría verse disminuida a una temperatura equivalente a la de almacenamiento y causar alteraciones morfológicas y aglomeración de micropartículas.

Degradación

La degradación de PLA/PLGA ocurre por hidrólisis no enzimática (Figura 1). A pesar de que existen numerosos estudios sobre la degradación de estos poliésteres, los datos obtenidos de polímero nativo en polvo o de muestras procesadas tales como películas, implantes o suturas quirúrgicas no son necesariamente representativos del mecanismo de degradación de las microesferas. Por tanto, se han realizado estudios específicos con microesferas elaboradas con diferentes PLA y PLGA (10). Los resultados mostraron que las microesferas de PLGA 50:50 de bajo peso molecular, el más hidrofílico, se degradaban *in vitro* aproximadamente en un mes, mientras que

las microesferas elaboradas con el polímero más hidrofóbico, D,L-PLA de gran peso molecular, requerían 12 a 16 meses para su hidrólisis completa. Son numerosos los estudios realizados para dilucidar el mecanismo de degradación *in vitro* e *in vivo* de PLA/PLGA y que ponen de manifiesto que la cinética de liberación de la molécula microencapsulada depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas del biopolímero (51-55), algunas de las cuales se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Propiedades de polímeros biodegradables derivados de ácido láctico y glicólico (PLGA).

Polímero	¹ Viscosidad intrínseca (dL/g)	T. Transición vítrea (°C)	Degradación (meses)
PLGA 50:50	0.55 – 0.75	45 – 50	1 – 2
PLGA 65:35	0.55 – 0.75	45 – 50	3 – 4
PLGA 75:25	0.55 – 0.75	50 – 55	4 – 6
PLGA 85:15	0.55 – 0.75	50 – 55	5 – 6
DL-PLA	0.55 – 0.75	55 – 60	12 – 16
L-PLA	0.90 – 1.2	60 – 65	>24
PGA	1.4 – 1.8	35 – 40	6 – 12

¹Viscosidad intrínseca: PLGA 50:50 y PLGA 65:35 determinada en hexafluoroisopropanol; todas las demás determinadas en cloroformo.

Biocompatibilidad

Como ya se dijo, la degradación de PLA/PLGA ocurre por hidrólisis no enzimática, y genera como productos finales, ácido láctico y ácido glicólico (Figura 1), los cuales son posteriormente eliminados del cuerpo por medio del ciclo de Krebs (56). Se ha demostrado la excelente biocompatibilidad de PLA/PLGA como materiales de sutura e implantes (57, 58). En el caso de sistemas de micropartículas para administración parenteral, es un hecho conocido que después de la inyección intramuscular, subcutánea o intradérmica, se genera una respuesta inflamatoria aguda con presencia de macrófagos como células mayoritarias, 15 días después de la inyección y al final de la degradación del biopolímero. Otros trabajos demostraron que no hubo un aumento significativo en nivel de IgE cuando se administraron formulaciones de microesferas que contenían antígenos peptídicos sintéticos encapsulados en un modelo murino (59, 60).

Los resultados obtenidos hasta el momento revelan que los sistemas de micropartículas elaborados con biopolímeros de PLA/PLGA constituyen sistemas seguros para la liberación controlada de moléculas con actividad biológica.

Métodos para la elaboración de microesferas

Los antígenos, como cualquier otra molécula biológicamente activa, pueden ser encapsulados en micropartículas mediante diferentes estrategias:

- Captura física durante la polimerización de una dispersión de monómeros.
- Captura física del antígeno durante la formación de micropartículas a partir de un polímero preexistente.
- Adsorción del antígeno sobre nanopartículas o micropartículas preexistentes.
- Anclaje químico de antígenos sobre la superficie o dentro de nanopartículas o micropartículas preexistentes.

La primera y última aproximaciones presentan más limitaciones por la presencia de agentes reactivos en las micropartículas, los cuales no pueden ser fácilmente eliminados o neutralizados durante el proceso o al final de éste. La tercera aproximación es una de las más frecuentemente utilizadas, ya que los dos constituyentes, tanto las micropartículas como la solución del antígeno, pueden ser purificados, y si es necesario esterilizados por separado antes de iniciar el proceso de adsorción. Sin embargo, a menos que otro mecanismo diferente de la adsorción esté involucrado, el antígeno será liberado rápidamente y sin la posibilidad de controlar este proceso por un tiempo prolongado (38).

La segunda aproximación se considera la más apropiada para la formulación de antígenos microencapsulados. En este contexto, las metodologías más comúnmente utilizadas son evaporación/extracción del solvente, coacervación o separación de fases y secado por atomización (*spray-drying*) (61, 62). Si bien el método de evaporación/extracción del solvente es indudablemente la técnica más frecuentemente empleada para la microencapsulación de antígenos, el secado por atomización tiene grandes ventajas en cuanto a la producción y escalado industrial. Dependiendo del método de microencapsulación seleccionado, se definen las características del producto final, las cuales deben estar de acuerdo con las siguientes especificaciones:

- **Tamaño de partícula.** Debe ser menor que 150 μm para poder ser inyectado con jeringas y agujas convencionales, y menor que 10 μm para una rápida y apropiada captación por macrófagos.
- **Morfología de la partícula y localización de la molécula activa en la microesfera.** Se considera criterio esencial de calidad la gran regularidad superficial y la baja porosidad. Las micropartículas pueden presentarse como un sistema de depósito, en el cual la molécula activa se encuentra localizada en un compartimiento central, o como un sistema monolítico con la molécula activa homogéneamente distribuida en toda la estructura.
- **Eficiencia de encapsulación.** Debe ser lo más alta posible, porque los antígenos

y polímeros sintéticos biodegradables son material muy costoso y no son fáciles de recuperar.

- **Cinética de liberación.** La rápida liberación *burst* durante las primeras 24 horas debe estar entre el 20 y 30% de la dosis total. El perfil de liberación puede mostrar un patrón de liberación constante o pulsátil.

Como se describe en la figura 2, en general los tres métodos se basan en la dispersión de la solución acuosa del antígeno en una solución orgánica del polímero, no miscible con la fase acuosa. Esta emulsión inicial W_1/O se obtiene por medio de homogenizadores estándar tales como los de turbina, generadores de ultrasonidos y homogenizadores a alta presión. En algunas ocasiones, los antígenos sintéticos de bajo peso molecular pueden disolverse directamente en la solución del polímero por adición de cosolventes. El solvente orgánico más frecuentemente utilizado es el diclorometano (DCM), el cual debe ser suficientemente volátil para ser eliminado durante la formación de las microesferas. Esta primera emulsión o disolución es entonces procesada siguiendo uno de los métodos descritos a continuación.

Evaporación / extracción del solvente orgánico

Mediante este método, la primera emulsión W_1/O se transfiere a un gran volumen de una solución acuosa W_2 (fase continua), la cual contiene un agente surfactante como estabilizante, y sometido a un proceso de homogenización a altas revoluciones se genera una doble emulsión ($W_1/O/W_2$). A continuación esta emulsión múltiple se deja en agitación continua para inducir la "evaporación del solvente" y de esta manera la precipitación de las microesferas después de pocas horas. Si la fase W_2 presenta una capacidad suficientemente alta para extraer la mayoría del solvente orgánico de la fase O, el proceso se denomina "extracción del solvente" (63). Finalmente, las microesferas pueden ser recuperadas mediante filtración o centrifugación.

Uno de los principales problemas de este método es la repartición entre W_1 y W_2 que puedan tener las moléculas activas solubles en agua, que dan lugar a bajas eficiencias de encapsulación. Se ha determinado que variables como la baja solubilidad del compuesto activo en soluciones acuosas, la alta viscosidad de la emulsión W_1/O , los volúmenes pequeños de las fases y la corta duración del proceso de precipitación de las microesferas reducen la pérdida de sustancia activa (64, 65). Puede conseguirse una disminución de la solubilidad del compuesto activo en agua variando el pH de W_1 o mediante modificaciones químicas del antígeno, y para aumentar la viscosidad de W_1/O se recomienda emplear soluciones muy concentradas de polímero o adicionar de agentes gelificantes (63, 65). Entre tanto, la reducción del tiempo para inducir la precipitación del polímero se considera una variable esencial para mejorar la eficacia de encapsulación. Tal como se ha reportado en algunos de nuestros estudios, para un sistema formado por una solución acuosa del antígeno (W_1), una solución de PLA/PLGA en DCM (O) y una fase continua (W_2), la adición de una solución acuosa

de alcohol isopropílico después de formar la doble emulsión aumenta la solubilidad del DCM en la fase W_2 y favorece de esta forma la precipitación de las microesferas en pocos minutos (26-30). Una de las principales ventajas del método de evaporación/extracción del solvente es su versatilidad para producir micropartículas en un amplio rango de tamaño (66).

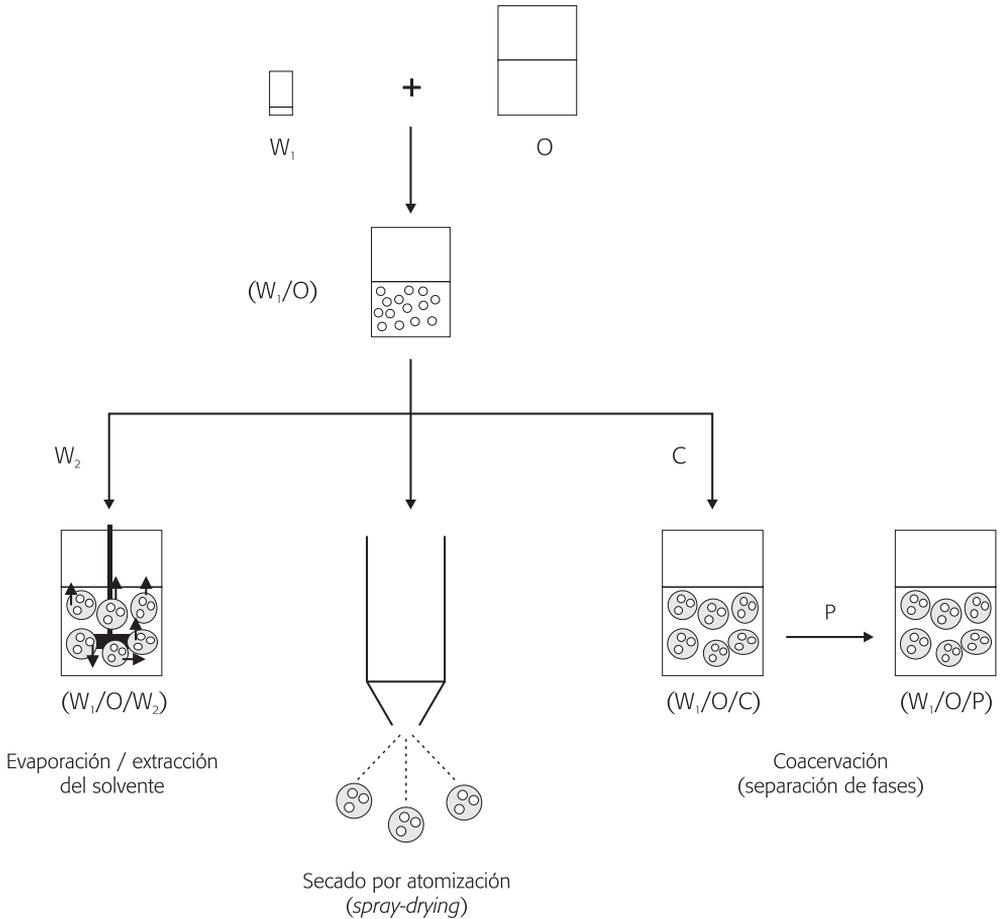


Figura 2. Esquema de la elaboración de microesferas de PLGA mediante tres metodologías. W_1 : solución acuosa de la molécula activa, O : solución de PLGA en diclorometano, W_2 : solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA), C : agente coacervante, P : agente precipitante.

Coacervación o separación de la fase orgánica

En este método, la formación de las microesferas se realiza mediante un proceso que consta de dos pasos; primero, una adición lenta de un agente coacervante a la emulsión W_1/O , y segundo, la incorporación en esta mezcla de un agente precipitan-

te. En la primera etapa se induce una separación de fases bajo agitación continua y se genera una fase rica en polímero llamada coacervado, en la cual se encuentra la solución de la molécula activa. En la segunda etapa, las gotas de coacervado se hacen más viscosas gracias a una más pronunciada desolvatación del polímero, momento en el cual se adiciona el agente precipitante. Los agentes coacervante y precipitante no deben ser solventes para el polímero; pueden ser miscibles con el solvente del polímero en alguna proporción, pero deben ser inmiscibles con agua. Un agente coacervante para PLA/PLGA es el aceite de silicona, y como agentes precipitantes se utilizan heptano y éter de petróleo, entre otros (60).

La coacervación es una técnica de microencapsulación relativamente compleja, la cual requiere ajustar para cada tipo de polímero las condiciones del proceso (67). La principal limitación de este método es la cantidad de materiales residuales en el producto final, y el hecho de que no es fácil obtener micropartículas de tamaño inferior a 10 μm . A pesar de la complejidad del proceso, la coacervación es un método apropiado para la encapsulación de compuestos muy solubles en agua y ha sido utilizado por algunos investigadores para la microencapsulación de antígenos (40, 42).

Secado por atomización, Spray-Drying

Un tercer y muy atractivo método para la microencapsulación de antígenos es la técnica de *spray-drying*. En este proceso, la emulsión W_1/O se atomiza directamente en forma de gotas sobre una corriente de aire caliente, en la cual el solvente orgánico se evapora y las partículas solidificadas se recogen mediante un sistema de aspiración ciclónico. Este método es muy simple, rápido y particularmente interesante para el escalado del proceso de microencapsulación. A pesar de estas ventajas, la utilización de este método para la microencapsulación de péptidos y proteínas es mínima, pues la exposición de estas moléculas a temperaturas superiores a 40 °C puede causar una rápida desnaturalización (42, 52).

Modo de acción del sistema de micropartículas

Liberación in vitro

Actualmente existen diferentes opiniones acerca de lo que constituye un óptimo perfil de liberación de un antígeno a partir de estos sistemas de liberación. Los inmunólogos están más interesados en que se trate de un perfil de liberación pulsátil y no de una liberación continua. Hay cierto consenso en torno a la idea de que una sola dosis debe liberar el antígeno durante un período de 3 a 6 meses, preferiblemente hasta 9 meses. La liberación de antígenos a partir de microesferas elaboradas con polímeros biodegradables y su relevancia en la respuesta inmunitaria inducida ha sido ampliamente investigada. La gran mayoría de los estudios se han realizado empleando antígenos convencionales tales como el toxoide tetánico (TT) (9, 39-42, 66, 68) y el toxoide diftérico (TD) (43, 69) y solamente muy pocos han utilizado antígenos sintéticos (10, 26-30, 46). Estas investigaciones han confirmado el potencial

inmunoestimulante de estos sistemas de micropartículas, pero no hay evidencia clara de la relación que debe existir entre el perfil de liberación *in vitro* de un antígeno y la respuesta inmunitaria inducida. Aún no es claro por qué un perfil de liberación sostenida o pulsátil observado *in vitro* no produce un efecto refuerzo en la respuesta inmunitaria *in vivo*.

En los estudios que realizamos (26-30) acerca de la cinética de liberación *in vitro* de un péptido sintético a partir de microesferas elaboradas con PLGA 50:50 y PLGA 75:25, se evidencian tres fases características.

- **Primera fase:** liberación o difusión del péptido localizado en o cerca de la superficie de la micropartícula, llamada efecto *burst*.
- **Segunda fase:** período latente de mínima liberación, el cual tiene lugar durante el proceso de hidrólisis del polímero.
- **Tercera fase:** liberación final debida a la erosión del polímero y disolución de fragmentos de bajo peso molecular.

Estos resultados se pueden visualizar en la figura 3, la cual representa la velocidad de liberación del péptido (cantidad de péptido liberado en función del tiempo). Tal como se observa en dicha figura, la liberación del péptido a partir de las microesferas elaboradas con PLGA 50:50 se lleva a cabo de forma pulsátil; primer pulso (día 1) y un segundo pulso (entre los días 30 y 63); sin embargo, en las microesferas elaboradas con PLGA 75:25 se observa un primer pulso en el primer día seguido de una liberación sostenida del péptido durante todo el período de estudio. Las diferencias observadas en el perfil de liberación, en función del tipo de copolímero de PLGA, permitieron diseñar formulaciones empleando asociaciones de microesferas con el propósito de realizar una administración única, en estudios de inmunogenicidad llevados a cabo en diferentes modelos animales. Los estudios realizados confirman este patrón trifásico de liberación, al menos para cargas de sustancia activa inferiores o iguales al 10%. A cargas mayores, la segunda y tercera fases de liberación resultan menos evidentes.

El mecanismo para la fase latente es el más controvertido. Se plantea que la libre difusión de la molécula activa puede ser inhibida, probablemente por algún tipo de interacción con el polímero. En este sentido, se ha sugerido un mecanismo de intercambio iónico entre grupos carboxilo del polímero con carga negativa, los cuales son generados en su proceso de hidrólisis y grupos funcionales del péptido cargados positivamente (10, 66, 70). Estos complejos iónicos pueden formarse solamente en condiciones específicas para cada péptido o proteína, tales como su punto isoeléctrico (PI), composición del medio de liberación (fuerza iónica, pH) y un posible microambiente ácido dentro de las microesferas, el cual puede ser generado durante la hidrólisis del polímero. Si la formación del complejo iónico es el principal mecanismo responsable para la inhibición de la difusión de la proteína de las microesferas de

PLA/PLGA, la obtención de un perfil de liberación pulsátil puede depender mucho más de las condiciones en que se realiza el ensayo *in vitro*, las cuales son a menudo diferentes de las condiciones de liberación *in vivo* (35).

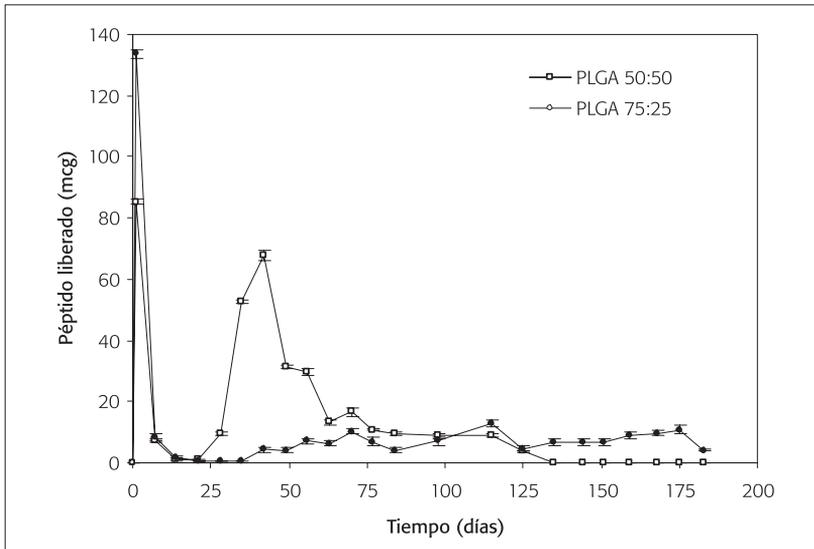


Figura 3. Perfil de liberación *in vitro* en microgramos del péptido sintético a partir de formulaciones de microesferas de PLGA 50:50 o PLGA 75:25 en función del tiempo. Resultados expresados como la media \pm SD para $n = 3$.

Por último, la generación de grandes cantidades de productos de degradación de carácter ácido dentro de la microesfera o en el medio de liberación puede afectar a la estabilidad de la proteína liberada y aún sin liberar. Estudios sobre la estabilidad de proteínas de origen biológico han demostrado que pierden actividad por variaciones del pH del medio, mientras que este comportamiento no fue observado en nuestros estudios cuando se trabajó con un antígeno sintético (9, 26, 27, 40).

Procesamiento *in vivo*

El destino de las microesferas administradas *in vivo* se encuentra bien establecido para algunas vías de administración, siendo el tamaño de partícula una variable importante en su procesamiento. La administración subcutánea e intramuscular de microesferas de PLGA induce a la formación de una cápsula fibrosa alrededor del lugar de inyección. Así mismo, en éste se produce una infiltración por macrófagos que fagocitan una fracción de las microesferas en un proceso dependiente del tamaño. Estudios realizados sobre fagocitosis de micropartículas han puesto de manifiesto que *in vitro* las microesferas de PLGA de tamaño inferior a 12 μm son fagocitadas por macrófagos, mientras que *in vivo*, las microesferas de tamaño entre 1 y 20 μm son

rodeadas por macrófagos (71-73). Se considera que la acción inmunoestimulante de las microesferas se debe principalmente a la fracción fagocitada, transportada a los nódulos linfáticos y procesada intracelularmente, para finalmente presentar los fragmentos del antígeno a los linfocitos T. Esto puede explicar por qué en algunos estudios, microesferas de mayor tamaño fueron menos inmunogénicas que microesferas menores (38, 74). Según estas observaciones, tanto el tamaño de partícula como el perfil de liberación del antígeno, su naturaleza e integridad son los criterios más importantes en la inducción de una eficiente respuesta inmunitaria. Se considera que una estimulación continua o pulsátil con el antígeno de los nódulos linfoides induce a la producción de células formadoras de anticuerpos. La presencia prolongada del antígeno simula la infección natural, a diferencia de cuando hay un contacto con el antígeno de menor duración.

Por otra parte, la administración de microesferas en las mucosas también ha evidenciado resultados alentadores en lo que se refiere a la inducción de una respuesta inmunitaria eficiente con diversos antígenos (11, 31, 44, 75, 76).

CONCLUSIÓN

Mediante la microencapsulación de moléculas activas en los biopolímeros PLA/PLGA se pueden obtener formulaciones viables en términos de seguridad y reproducibilidad, de conformidad con las normas de correcta fabricación. A pesar de ciertas limitaciones, las microesferas elaboradas con polímeros biodegradables derivados de PLA/PLGA, representan un sistema promisorio para la administración de antígenos sintéticos, con el propósito de producir una respuesta inmunitaria eficiente y prolongada después de una sola inmunización. De los temas pendientes, se plantea el de validar este proceso de microencapsulación en condiciones asépticas y la apropiada selección de un método de esterilización para el producto final. Esto aún permanece como un reto para el desarrollo de una formulación ideal para la administración de estos sistemas en una sola dosis. Además, es posible contemplar su aplicación para el diseño de sistemas para la liberación controlada de otras moléculas activas biológicamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. R. Langer, New methods of drug delivery, *Science*, **249**, 1527 (1990).
2. A. Sánchez, J. L. Vila-Jato, M. J. Alonso, Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled release of cyclosporin A, *Int J Pharm*, **99**, 263 (1993).
3. N. Erden, N. Celebi, Factors influencing release of salbutamol sulphate from poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique, *Int J Pharm*, **137**, 57 (1996).

4. S. Prior, C. Gamazo, J. M. Irache, H. P. Merkle, B. Gander, Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating *Brucella* infections, *Int J Pharm*, **196**, 115 (2000).
5. H. S. Choi, S. A. Seo, G. Khang, J. M. Rhee, H. B. Lee, Preparation and characterization of fentanyl-loaded PLGA microspheres: in vitro release profiles, *Int J Pharm*, **234**, 195 (2002).
6. F. I. Liu, J. H. Kuo, K. C. Sung, O. Y. P. Hu, Biodegradable polymeric microspheres for nalbuphine prodrug controlled delivery: in vitro characterization and in vivo pharmacokinetic studies, *Int J Pharm*, **257**, 23 (2003).
7. A. Gupte, K. Ciftci, Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel + 5-FU microspheres, *Int J Pharm*, **276**, 93 (2004).
8. S. Duwuri, K. Gaurav Janoria, A. K. Mitra, Development of a novel formulation containing poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres dispersed in PLGA-PEG-PLGA gel for sustained delivery of ganciclovir, *J Control Release*, **108**, 282 (2005).
9. M. J. Alonso, R. K. Gupta, C. Min, G. R. Siber, R. Langer, Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems, *Vaccine*, **12**, 299 (1994).
10. C. Thomasin, G. Corradin, Y. Men, H. P. Merkle, B. Gander, Tetanus toxoid and a synthetic malaria antigen in PLA/PLGA microspheres: Importance of polymer degradation and antigen release for immunological response, *J Control Release*, **41**, 131 (1996).
11. M. Igartua, R. M. Hernández, A. Esquisabel, A. R. Gascón, M. B. Calvo, J. L. Pedraz, Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres, *J Control Release*, **56**, 63 (1998).
12. K. D. Newman, M. W. McBurney, Poly(D,L lactic-co-glycolic acid) microspheres as biodegradable microcarriers for pluripotent stem cells, *Biomaterials*, **25**, 5763 (2004).
13. W. Jiang, R. K. Gupta, M. C. Deshpande, S. P. Schwendeman, Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens, *Adv Drug Delivery Reviews*, **57(3)**, 391 (2005).
14. J. Kreuter, P. P. Speiser, New adjuvants on a poly (methylmethacrylate) base, *Infect Immun*, **13**, 204 (1976).
15. I. Preis, R. S. Langer, A single-step immunization by sustained antigen release, *J Immunol Methods*, **28**, 193 (1979).
16. J. Kreuter, U. Berg, E. Liehl, M. Soliva, P. P. Speiser, Influence of particle size on the adjuvant effect of particulate polymeric adjuvants, *Vaccine*, **4**, 125 (1986).

17. J. Kreuter, Possibilities of using nanoparticles as carriers for drugs and vaccines, *J Microencapsulation*, **5**, 115 (1988).
18. P. Arturson, I. L. Martenson and I. Sjöholm, Biodegradable microspheres III: Some immunological properties of polyacryl starch microparticles, *J Pharm Sci*, **75**, 697 (1986).
19. D. T. O'Hagan, D. Rafferty, S. Wharton, L. Illum, Intravaginal Immunization in sheep using a bioadhesive microsphere antigen delivery system, *Vaccine*, **11**, 660 (1993b).
20. R. Nakaoka, Y. Tabata, Y. Ikada, Potentiality of gelatin microspheres as immunological adjuvant, *Vaccine*, **13**, 653 (1995).
21. C. Langhein, J. F. E. Newman, Antibody response to bacterial antigen covalently bound to biodegradable polymerized serum albumin beads, *J Appl Bacteriol*, **63**, 443 (1987).
22. J. H. Eldridge, C. J. Hammond, J. A. Meulbroek, J. K. Staas, R. M. Gilley, T. R. Tice, Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissue. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches, *J Control Rel*, **11**, 205 (1990).
23. D. T. O'Hagan, K. J. Palin, S. S. Davis, Poly (butyl-2-cyanoacrylate) particles as adjuvants for oral immunization, *Vaccine*, **7**, 213 (1989).
24. M. T. Aguado, P. H. Lambert, Controlled release vaccine, Biodegradable poly-lactide/polyglycolide (PL/PG) microspheres as antigen vehicles, *Immunobiology*, **184**, 113 (1992).
25. M. T. Aguado, Future approaches to vaccine development: Single-dose vaccines using controlled-release delivery systems, *Vaccine*, **11**, 596 (1993).
26. J. E. Rosas, R. M. Hernández, A. R. Gascón, M. Igartua, F. Guzmán, M. E. Patarroyo, J. L. Pedraz, Biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for malaria synthetic peptide SPf66, *Vaccine*, **19**, 4445, (2001).
27. J. E. Rosas, J. L. Pedraz, R. M. Hernández, A. R. Gascón, M. Igartua, F. Guzmán, R. Rodríguez, J. Cortés, M. E. Patarroyo, Remarkably high antibody levels and protection against *P. falciparum* malaria in Aotus monkeys after a single immunisation of SPf66 encapsulated in PLGA microspheres, *Vaccine*, **20**, 1707 (2002).
28. A. M. Carcaboso, R. M. Hernández, M. Igartua, A. R. Gascón, J. E. Rosas, M. E. Patarroyo, J. L. Pedraz, Immune response after oral administration of the encapsulated malaria synthetic peptide SPf66, *Int J Pharm*, **260**, 273 (2003).

29. A. M. Carcaboso, R. M. Hernandez, M. Igartua, J. E. Rosas, M. E. Patarroyo, J. L. Pedraz, Potent, long lasting systemic antibody levels and mixed Th1/Th2 immune response after nasal immunization with malaria antigen loaded PLGA microparticles, *Vaccine*, **22**, 1423 (2004).
30. A. M. Carcaboso, R. M. Hernández, M. Igartua, J. E. Rosas, M. E. Patarroyo, J. L. Pedraz, Enhancing Immunogenicity and Reducing Dose of Microparticulated Synthetic Vaccines: Single Intradermal Administration, *Pharm Res*, **21**, 121 (2004).
31. I. Gutierrez, R. M. Hernandez, M. Igartua, A. R. Gascón, J. L. Pedraz, Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres, *Vaccine*, **21**, 67 (2002).
32. Chien-Hua Niu, Yuan-Yuan Chiu, FDA perspective on peptide formulation and stability issues, *J Pharm Sci*, **87**, 1331 (1998).
33. T. R. Tice, E. S. Tabibi, Parenteral drug delivery: injectables, in: A Kydonieus, editor, *Treatise on controlled drug delivery: fundamentals optimization, applications*, Marcel Dekker, New York, 1991, pp. 315-39.
34. Lewis D. H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers, in: Chasin M., Langer R., editors, *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, Marcel Dekker, New York, 1990. pp. 1-41.
35. L. M. Sanders, J. S. Kent, G. I. McRae, B. H. Vickery, T. R. Tice, D. H. Lewis, Controlled release of luteinizing hormona-releasing hormona analogue from poly (d,l.lactide-co-glicolide) microspheres, *J Pharm Sci*, **73**, 1294 (1984).
36. L. R. Beck, C. F. Flowers, D. T. Jr.Cowsar, A. C. Tanquary. *U. S. Patent 4.756.907* (1988).
37. D. T. O'Hagan, J. P. McGhee, J. Holmgren, Biodegradable microparticles for oral immunization, *Vaccine*, **11**, 149 (1993a).
38. D. T. O'Hagan, H. Jeffery, S. S. Davis, Long-Term Antibody responses in Mice Following Subcutaneous Immunization with Ovalbumin Entrapped in biodegradable microparticles, *Vaccine*, **11**, 965 (1993c).
39. A. J. Almeida, H. O. Alpar, M. R. W. Brown, Immune response to nasal delivery of antigenically intact tetanus toxoid associated with poly(L-lactic acid) microspheres in rats, rabbits and guinea-pigs, *J Pharm Pharmacol*, **45**, 198 (1993).
40. I. Esparza, T. Kissel, Parameters affecting the immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid, *Vaccine*, **10**, 714 (1992).

41. R. K. Gupta, G. R. Siber, M. J. Alonso, R. Langer, Development of a single-dose tetanus toxoid based on control release from biodegradable and biocompatible polyester microspheres, in: *Vaccines - Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993, pp. 391-396.
42. Y. Men, C. Thomasin, H. P. Merkle, B. Gander, G. Corradin, A single administration of tetanus toxoid in biodegradable microspheres elicits T cell and antibody responses similar or superior to those obtained with aluminum hydroxide, *Vaccine*, **13**, 683 (1995).
43. M. Singh, A. Singh, G. P. Talwar, Controlled delivery of diphtheria toxoid using biodegradable poly (D,L-lactide) microcapsules, *Pharm Res*, **8**, 958 (1991).
44. J. H. Eldridge, C. J. Hammond, J. A. Meulbroek, J. K. Staas, R. M. Gilley, T. R. Tice, Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissue. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches, *J Control Release*, **11**, 205 (1990).
45. J. Cleland, M. Powell, A. Lim, L. Barron, P. Berman, D. Eastman, J. Nunberg, T. Wrin, J. Vennari, Development of a single shot subunit vaccine for HIV-1, *AIDS Res Hum Retroviruses*, **10**, S21 (1994).
46. Y. Men, G. Corradin, C. Thomasin, H. P. Merkle, B. Gander, Immunopotential of a synthetic antigen by incorporation into biodegradable microspheres, *Proc Intern Symp Control Rel Bioact Mater*, **21**, 50 (1994).
47. S. Amselem, C. R. Alving, A. J. Domb, Polymeric biodegradable lipospheres™ as vaccine delivery systems, *Polym Adv Technol*, **3**, 351 (1992).
48. H. R. Kricheldorf, J. M. Jonte, M. Berl, Polylactones III. Copolymerization of glycolide with D,L-lactide and other lactones, *Makromol Chem*, **12**, 25 (1985).
49. S. Cohen, M. J. Alonso, R Langer, Novel approaches to controlled release antigen delivery, *Int J Technol Assessment Health Care*, **10**, 121 (1994).
50. X. S. Wu, Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers, in: Wise et al., editors, *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 1015-54.
51. K. Makino, H. Ohshima, T. Kondo, Effects of plasma proteins on degradation properties of poly (L-lactide) microcapsules, *Pharm Res*, **4**, 62 (1987).
52. H. T. Wang, H. Palmer, R. J. Linhardt, D. R. Flanagan, E. Schmitt, Degradation of poly(ester) microspheres, *Biomaterials*, **11**, 679 (1990).

53. S. Cohen, T. Yoshioka, M. Lucarelli, L. H. Hwang, R. Langer, Controlled delivery systems for proteins based on poly (lactide/glycolic acid) microspheres, *Pharm Res*, **8**, 713 (1991b).
54. D. T. O'Hagan, H. Jeffery, S. S. Davis, The preparation and characterization of poly (lactide-co-glycolide) microparticles: III Microparticle/polymer degradation rates and the in vitro release of a model protein, *Int J Pharm*, **103**, 37 (1994a).
55. C. Thomasin, P. Johansen, R. Alder, R. Bemsel, G. Hottinger, H. Altorfe, A. D. Wright, E. Wehrli, H. P. Merkle, B. Gander, Approaching the problem of residual solvent in biodegradable microspheres prepared by coacervation, *Europ J Pharm Biopharm*, **42**, 16 (1996b).
56. D. Lewis, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers, in: *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, Marcel Dekker, New York, 1990, pp 1-41.
57. B. Amecke, D. Bendix, G. Entenmann. Resorbable polyesters: Composition, properties, applications, *Clinical Materials*. **10**, 47 (1992).
58. A Weiler, R. Hoffmann, A. Stähelin, H. Helling, N. Südkamp, Biodegradable implants in sports medicine: The biological base, *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. **16**, 305 (2000).
59. G. E. Visscher, R. L. Robinson, H. V. Maulding, J. W. Fong, J. E. Pearson, G. J. Argentieri, Biodegradation of and tissue reaction to poly(DL-lactide)microcapsules, *J Biomed Mater Res*, **20**, 667 (1986).
60. K. Yamaguchi, J. M. Anderson, In vivo biocompatibility studies of medisorb® 65/35 D,L-lactide/glycolide copolymer microspheres, *J Control Release*, **24**, 81 (1993).
61. D. W. Newton, Coacervation: Principles and applications, in: *Polymers for controlled drug delivery*, CRC Press, Boca Ratón, 1991, pp. 67-81.
62. C. Aftabrouhad, E. Doelker, Méthodes de preparation des microparticules biodégradables chargées en principes actifs hydrosolubles, *Pharma Sciences*, **2**, 365 (1992).
63. S. Freitas, H. P. Merkle, B. Gander, Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology, *J Control Release*, **102**, 313 (2005).
64. R. Alex, R. Bodmeier, Encapsulation of ether soluble drugs by modified solvent evaporation method. I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment, *J Microencapsulation*, **7**, 347 (1990).

65. Y. Ogawa, M. Yamamoto, H. Okada, T. Yashika, T. Shimamoto, A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microspheres of polylactic acid or copoly (lactic/glycolid) acid, *Chem Pharm Bull*, **36**, 1095 (1988).
66. M. J. Alonso, S. Cohen, T. G. Park, R. K. Gupta, G. R. Siber, R. Langer, Determinants of release rate of tetanus vaccine from polyester microspheres, *Pharm Res*, **10**, 945 (1993).
67. J. M. Ruiz, J. P. Busnel and J. P. Benoit, Influence of average molecular weights of poly (D,L-lactic acid-co-glycolic acid) copolymers 50/50 on phase separation and in vitro drug release from microspheres, *Pharm Res*, **7**, 928 (1990).
68. G. Spenlehauer, M. Vert, J. P. Benoit, A. Boddaert, In vitro and in vivo degradation of poly-(D,L- lactide/glicolide) type microspheres made by solvent evaporation method, *Biomaterials*, **10**, 557 (1989).
69. M. Singh, O. Singh, A. Singh, G. P. Talwar, Immunogenicity studies on diphtheria toxoid loaded biodegradable microspheres, *Int J Pharm*, **85**, R5 (1992).
70. D. Bodmer, T. Kissel, E. Traechslin, Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems, *J Control Release*, **21**, 129 (1992).
71. M. Kanke, E. Porlier, R. Geissler, D. Powell, A. Kaplan, P. DeLuca, Interaction of microspheres with blood constituents. II. Uptake of biodegradable particles by macrophages, *J Parent Sci Technol*, **40**, 114 (1986).
72. M. Kanke, R. Geissler, D. Powell, A. Kaplan, P. DeLuca, Interaction of microspheres with blood constituents.III. Macrophage Phagocytosis of various types of polymeric drug carriers, *J Parent Sci Technol*, **42**, 157 (1988).
73. A. Galelli, B. Charlot, E. Deriaud, C. Leclerc, B-Cells do not present antigen covalently linked to microspheres, *Immunol*, **79**, 69 (1993).
74. J. H. Eldridge, J. K. Staas, J. A. Meulbroek, T. R. Tice, R. M. Gilley, Biodegradable and biocompatible poly (DL-lactide-co-glicolide) microspheres as an adjuvant for Staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies, *Infect Immun*, **59**, 2978 (1991b).
75. J. Mestecky, Z. Moldoveanu, M. Novak, W. Q. Huang, R. M. Gilley, J. K. Staas, D. Schafer, R. W. Compans, Biodegradable microspheres for the delivery of oral vaccines, *J Control Release*, **28**, 131 (1994).
76. J. Xu-Amano, R. J. Jackson, K. Fujihashi, H. Kiyono, H. F. Staats, J. R. McGhee, Helper Th1 and Th2 responses following mucosal or systemic immunization with cholera toxin, *Vaccine*, **12**, 903 (1994).