

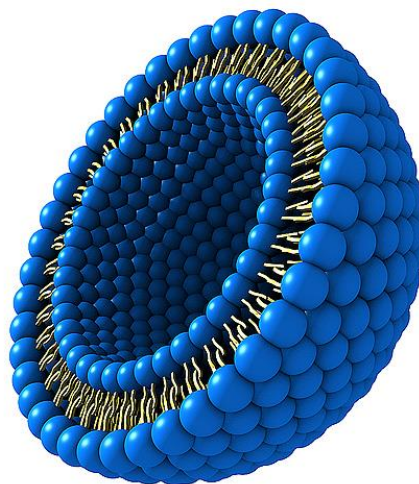


# NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

**PABLO VALENZUELA RIVERO**

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla





**Universidad de Sevilla**

**Facultad de Farmacia**

- Trabajo Fin de Grado.
- Grado en Farmacia.
- Título del Trabajo: Nuevos Sistemas de Liberación de Péptidos y Proteínas.
- Nombre del estudiante: Pablo Valenzuela Rivero.
- Lugar y fecha de presentación: Facultad de Farmacia, 4 de Julio de 2017.
- Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
- Tutoras del trabajo: Marta Casas Delgado y Mercedes Ángela Aguilar de Leyva.
- Revisión bibliográfica.

## RESUMEN

Los péptidos, proteínas y anticuerpos se han convertido en importantes biofármacos que se utilizan con éxito para tratar muchas enfermedades que se consideraban incurables hasta hace poco. En la actualidad, la mayoría de las proteínas terapéuticas se administran por vía parenteral, la cual tiene muchos inconvenientes, como el dolor, el coste y el rápido aclaramiento de las mismas. Desgraciadamente, la administración de proteínas y péptidos por otras vías no invasivas como la nasal, oral, colónica, pulmonar, ocular o transdérmica, se enfrenta todavía a muchos obstáculos. Esto es debido a sus características, como su estructura intrínsecamente vulnerable y su susceptibilidad a la degradación enzimática, las cuales provocan una baja estabilidad fisicoquímica y biológica y una inmunogenicidad que pueden limitar sus potenciales beneficios, y en algunos casos, su utilidad. Se han empleado muchas tecnologías para resolver estos problemas aumentando la biodisponibilidad de los fármacos, disminuyendo los efectos secundarios, aumentando la facilidad de uso por los pacientes y reduciendo el coste de fabricación tanto como sea posible. Con el objetivo de superar estos obstáculos y mejorar la eficacia de los péptidos y proteínas como medicamentos, se han desarrollado varias estrategias, como el uso de potenciadores de la penetración, la inhibición enzimática, la modificación de la estructura de la proteína, como la PEGilación, y la protección por encapsulación, mediante la utilización de liposomas, emulsiones múltiples o nanopartículas. Concretamente, las nanopartículas constituyen un adecuado sistema para el transporte de proteínas ya que aumentan su biodisponibilidad, controlan su liberación y son biocompatibles. Esta revisión proporciona una detallada descripción de todos estos puntos para recalcar la importancia y el potencial de los péptidos y proteínas como medicamentos.

Palabras clave:

- Proteína
- Liberación de fármacos
- Vía de administración
- Nanopartícula
- Liposoma

## ÍNDICE

1. Introducción .....	pág. 4
1.1. Usos potenciales de las proteínas en el campo médico.....	pág. 5
2. Objetivos.....	pág. 8
3. Metodología.....	pág. 8
4. Resultados y Discusión.....	pág. 9
4.1. Los desafíos y obstáculos a los que se enfrenta el uso de fármacos con proteínas.....	pág. 9
4.2. Vías de administración de proteínas.....	pág. 10
4.2.1. Vía parenteral.....	pág. 10
4.2.2. Vías de administración no invasivas.....	pág. 10
4.2.2.1. Administración de proteínas por vía nasal.....	pág. 10
4.2.2.2. Administración de proteínas por vía oral.....	pág. 12
4.2.2.2.1. Administración de proteínas por vía colónica.....	pág. 13
4.2.2.3. Administración de proteínas por vía pulmonar.....	pág. 14
4.2.2.4. Administración de proteínas por vía ocular .....	pág. 15
4.2.2.5. Administración de proteínas por vía rectal.....	pág. 16
4.2.2.6. Administración de proteínas por vía transdérmica.....	pág. 16
4.3. Estrategias usadas para mejorar la biodisponibilidad de péptidos y proteínas.....	pág. 17
4.3.1. Potenciadores de la penetración.....	pág. 17
4.3.2. Inhibidores enzimáticos.....	pág. 21
4.3.3. Modificación de la estructura proteica por conjugación de polímeros.....	pág. 22
4.3.4. Encapsulación de proteínas: sistemas de liberación.....	pág. 23
4.3.4.1. Liposomas.....	pág. 24
4.3.4.2. Emulsiones múltiples.....	pág. 25
4.3.4.3. Nanopartículas poliméricas.....	pág. 26
4.3.4.4. Nanopartículas sólidas lipídicas (SNL).....	pág. 27
5. Conclusión.....	pág. 29
6. Bibliografía.....	pág. 30

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las proteínas son un componente vital del cuerpo debido a que desempeñan muchos de sus principales procesos fisiológicos y biológicos. Las proteínas y péptidos son el pilar del sector biofarmacéutico; más de 200 productos farmacológicos de proteínas están actualmente en el mercado (Walsh, 2010) y otras que se encuentran actualmente en ensayos preclínicos y clínicos (Overton, 2014). Recientemente, las proteínas y los péptidos han atraído una gran atención como tratamientos potenciales para varias enfermedades peligrosas y tradicionalmente incurables como el cáncer, SIDA, diabetes, enanismo, desórdenes autoinmunes, infecciones y enfermedades inflamatorias. Además, las proteínas se pueden usar como agentes de diagnóstico (Cázares-Delgadillo et al., 2011; Leader et al., 2008) y se pueden usar en vacunas como método para la profilaxis frente a varias enfermedades (Chura-Chambi et al., 2013).

Las proteínas son moléculas complejas en términos de su estructura y función y, a diferencia de muchos productos farmacéuticos, no pueden ser sintetizados químicamente. Por lo tanto, las proteínas se fabrican en procesos biológicos, por lo general dentro de las células huésped (aunque existe un número creciente de tecnologías de expresión libres de células). Estas proteínas, sintetizadas en una célula huésped frecuentemente de una especie diferente a su origen, se denominan "proteínas recombinantes" porque el ADN que las codifica ha sido recombinado o diseñado (Overton, 2014). Las líneas celulares humanas han surgido como una nueva y poderosa alternativa para la producción de proteínas terapéuticas humanas porque se espera que este sistema de expresión produzca proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales más similares a su contraparte natural y reduzca las potenciales reacciones inmunógenas contra epítomos no humanos (Swiech et al., 2012).

Sin embargo, el uso de fármacos con proteínas se enfrenta a numerosos retos e impedimentos, como por ejemplo que tienen una baja permeabilidad en las células (Camenisch et al., 1998), que pierden la estructura terciaria con facilidad, que poseen un tiempo de vida media muy corto (Muheem et al., 2016) o que sufren una considerable degradación en el estómago y duodeno (Rubinstein, 1995; Van den y Kinget, 1995).

Para superar estos obstáculos y mejorar la biodisponibilidad de las proteínas se han desarrollado varias estrategias, como el uso de potenciadores de la penetración, el uso de los inhibidores enzimáticos, la modificación de la estructura proteica por conjugación de polímeros o la encapsulación de proteínas, siendo los más destacados los liposomas, las emulsiones múltiples, las nanopartículas poliméricas y las nanopartículas sólidas lipídicas (Renukuntla et al., 2013).

Actualmente, la mayoría de proteínas terapéuticas se administran por vía parenteral, pero tiene varios inconvenientes, como por ejemplo que es doloroso y no muy bien tolerado por los pacientes. La clave para el éxito terapéutico y comercial es buscar vías alternativas de administración de péptidos y proteínas que sean más efectivas, más sencillas y más seguras por lo que se están desarrollando otras vías de administración no invasivas, entre las cuales se encuentran la vía nasal, oral, pulmonar, ocular, rectal o dérmica (Antosova et al., 2009).

### **1.1 Usos potenciales de las proteínas en el campo médico.**

El uso de las proteínas y péptidos como fármacos para el tratamiento de enfermedades es cada vez más actual y sus posibles aplicaciones están experimentando un crecimiento significativo.

En los últimos 30 años, la FDA ha aprobado productos biológicos para el diagnóstico y tratamiento de una amplia gama de enfermedades. Muchos de los fármacos biológicos más exitosos están indicados para enfermedades autoinmunes; los productos biológicos para el tratamiento de la artritis reumatoide representan casi el 13% del mercado biofarmacéutico. Otra gran parte del mercado es la concerniente al uso de los biológicos para el tratamiento del cáncer, incluyendo cánceres de sangre (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin), tumores sólidos (por ejemplo, carcinoma de células escamosas), tumores primarios (Glioblastoma multiforme), y eventos metastáticos (por ejemplo, metástasis esqueléticas). Los productos biológicos para el tratamiento de enfermedades diversas, tales como eventos respiratorios (por ejemplo, asma alérgica), trastornos degenerativos del sistema nervioso central (por ejemplo, esclerosis múltiple) y afecciones gastrointestinales crónicas (por ejemplo, enfermedad de Crohn) están entre las áreas de más rápido crecimiento en el mercado (Rodgers y Chou, 2016).

En la tabla 1 podemos ver los péptidos comercializados con un peso molecular inferior a 9 kD (Maher et al., 2016).

Generic name	Trade name®	Manufacturer	Delivery	MW	Classification/application
Eptifibatide	Integrilin	GSK	IV	832	Anti-platelet drug
Octreotide	Sandostatin	Novartis	SC, IV	1019	Somatostatin analogue
Desmopressin	DDAVP	Ferring	Oral	1069	Synthetic vasopressin analogue
Vasopressin	Pitressin	Goldshield	SC, IM	1084	Antidiuretic peptide
Lanreotide	Somatuline LA	Ipsen	IM	1096	Somatostatin analogue
GnRH	HRF	Intrapharm	SC	1182	Peptide hormone
Cyclosporin	Neoral	Novartis	Oral	1203	Immunosuppressant peptide
Leuprorelin/leuprolide acetate	Prostap	Takeda	SC, IM	1209	GnRH agonist
Terlipressin	Glypressin	Ferring	IV	1227	Synthetic vasopressin analogue
Mifamurtide	Mepact	Takeda	IV	1238	Osteosarcoma
Buserelin	Suprefact	Sanofi-Aventis	SC, Nasal	1239	GnRH agonist
Goserelin	Zoladex	AstraZeneca	Implant	1269	GnRH super agonist
Icatibant	Firazyr	Shire HGT	SC	1305	Hereditary angioedema
Triptorelin	Decapeptyl SR	Ipsen	IM	1312	GnRH agonist
Nafarelin	Synarel	Pharmacia	Nasal	1322	GnRH agonist
Histrelin	Vantas	Orion	Implant	1324	GnRH agonist
Abarelix	Plenaxis	Speciality European Pharma Ltd		1416	Prostate cancer
Cetrorelix	Cetrotide	Merck Sorono	SC	1431	GnRH antagonist
Vancomycin	Vancocin matrigel	Flynn Pharma	Oral (local),	1486	Antibiotic peptide
Linaclootide	Linzess	Ironwood Pharma	Oral (local)	1527	IBS
Degarelix	Firmagon	Ferring	SC	1631	GnRH antagonist
Bivalirudin	Angiox	The Medicines Company	IV	2180	Anticoagulant
Tetracoactide	Synacthen	Alliance	SC	2933	ACTH analogue
Tetracosactide	Synacthen	Alliance	IM, IV	2933	Corticotrophin analogue
Salmon calcitonin	Miacalcic	Novartis	SC, IV, Nasal	3432	Anti-osteoporotic peptide
Nesiritide	Natrecor	Scios Inc	IV	3464	human B-type natriuretic peptide
Glucagon	Glucagon	Novo Nordisk	SC, IM, IV	3483	Antidiabetic peptide
Liraglutide	Victoza	Novo Nordisk	SC	3751	GLP-1 analogue agonist peptide
Teduglutide	Gattex/Nycomed	NPS Pharma	SC	3752	GLP-2 analogue agonist peptide
Pramlintide	Symlin	AstraZeneca	SC	3951	Analogue of Amylin
teriparatide	Forsteo	Lilly	SC	4118	rh parathyroid hormone (analogue)
Exenatide	Byetta	Lilly/Amylin	SC	4187	Exendin-4
Enfuvirtide	Fuzeon	Roche	SC	4492	Antiviral peptide
rh Insulin	Actrapid	Novo Nordisk	SC	5808	Antidiabetic peptide
rh Insulin	Insuman rapid	Sanofi Aventis	SC	5808	Antidiabetic peptide
rh Insulin	Humulin S	Lilly	SC	5808	Antidiabetic peptide
Insulin lispro	Humalog	Lilly	SC	5808	Analogue of rh insulin
Insulin glulisine	Apidra	Sanofi Aventis	SC	5823	Analogue of rh insulin
Insulin aspart	NovoRapid	Novo Nordisk	SC	5826	Analogue of rh insulin
Insulin detemir	Levemir	Novo Nordisk	SC	591	Analogue of rh insulin
Insulin glargine	Lantus	Sanofi Aventis	SC	6063	Analogue of rh insulin
Glatiramer acetate	Copaxone	Teva Pharma	SC	6400	Immunomodulator peptide
Ecallantide	Kalbitor	Dyax	SC	7054	Hereditary angioedema
Mecasermin	Increlax	Ipsen	SC	7649	rh insulin like growth factor-1
rh PTH	Preotact	Nycomed	SC	9000	Anti-osteoporotic peptide

MW = molecular weight; SC = subcutaneous injection; IM = intramuscular injection; IV = Intravenous injection or infusion; rh = recombinant human.

**Tabla 1.** Péptidos terapéuticos comercializados.

A continuación, se exponen varios ejemplos de fármacos proteicos con sus respectivas indicaciones terapéuticas:

- Las indicaciones aprobadas para la terapia con Hormona del Crecimiento incluyen el tratamiento de la deficiencia de hormona del crecimiento (en niños y en adultos), el síndrome de Turner, el síndrome de Prader-Willi, la insuficiencia renal crónica y, más recientemente, la talla baja idiopática en niños, la debilidad relacionada con el SIDA y la acumulación de grasas asociada con lipodistrofia en adultos (Cázares-Delgado et al., 2011).
- El HsTX1 [R14A] es un péptido bloqueador potente y selectivo del canal Kv1.3 con potencial para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Jin et al., 2016).
- La fibronectina junto con el factor de crecimiento similar a insulina y la sustancia P se usa en algunas enfermedades oculares, como la queratopatía punteada superficial, defectos epiteliales persistentes de la córnea, o en la erosión corneal (Nishida et al., 2015).
- Recientemente y como consecuencia del incremento de las resistencias microbianas ante los antibióticos convencionales, se está estudiando el uso de los péptidos como potenciales

agentes antimicrobianos (Nordström y Malmsten, 2017). Los Péptidos Antimicrobianos (AMP) exhiben una actividad de amplio espectro frente a una amplia variedad de bacterias, hongos, virus y parásitos, e incluso células cancerosas. También muestran propiedades inmunomoduladoras potenciales y son altamente sensibles a agentes infecciosos y moléculas inmunoestimuladoras innatas (Lakshmaiah Narayana y Chen, 2015).



## **2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN.**

El objetivo general de esta revisión es profundizar en el estudio de los sistemas de liberación de péptidos y proteínas que han surgido en los últimos años para el tratamiento de numerosas enfermedades. Para conseguirlo, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una primera búsqueda sobre aplicaciones de los fármacos con proteínas y péptidos en la terapéutica actual.
- Identificar las dificultades a las que se enfrenta el uso de fármacos con péptidos y proteínas.
- Describir las posibles vías de administración de los péptidos y proteínas.
- Detallar las estrategias usadas para mejorar la biodisponibilidad de dichos fármacos.

## **3. METODOLOGÍA.**

Se han utilizado las bases de datos ScienceDirect, Pubmed, Scopus y Springer Link. El intervalo de años que se ha buscado para la revisión bibliográfica es del 2010 hasta el 2017. Los descriptores utilizados en la búsqueda han sido principalmente:

- protein delivery
- peptide delivery
- drug release
- oral delivery
- nasal delivery
- pulmonar delivery
- rectal delivery
- colonic delivery
- ocular delivery
- enzymatic inhibitor
- polymer conjugation
- penetration enhancers
- nanostructured lipid carrier
- solid lipid nanoparticle
- liposome

En total se han analizado 105 artículos científicos en la elaboración de la revisión bibliográfica, con la ayuda del gestor bibliográfico Mendeley.

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

##### **4.1. Desafíos y obstáculos a los que se enfrenta el uso de fármacos con proteínas.**

Las características fisicoquímicas de los péptidos y proteínas presentan una serie de inconvenientes a la hora de desarrollar fármacos basados en estas macromoléculas para el tratamiento de numerosas enfermedades. Estos inconvenientes se resumen en los siguientes puntos (Muheem et al., 2016):

- I. El gran peso molecular, el tamaño y la presencia de fragmentos tanto hidrófilos como hidrófobos en su estructura hacen que las proteínas penetren con dificultad en las células y otros compartimentos del cuerpo y, por lo tanto, imparten características de permeabilidad deficientes a través de diversas superficies mucosas y membranas biológicas. Comúnmente, las proteínas terapéuticas y los péptidos son hidrófilos con un  $\log P < 0$  (Camenisch et al., 1998).
- II. Muchas proteínas terapéuticas y péptidos son eficaces en gran parte debido a su estructura terciaria, que se puede perder en diversos ambientes físicos y químicos, dando como resultado su desnaturalización o degradación con la consecuente pérdida de actividad biológica, haciendo que estas moléculas sean inherentemente inestables.
- III. Muchas proteínas y péptidos tienen semividas biológicas muy cortas debido a su rápida eliminación por enzimas proteolíticas o por otros mecanismos de eliminación.
- IV. Una dosificación clínica precisa es de suma importancia ya que las proteínas y péptidos realizan acciones específicas y son altamente potentes.
- V. El cuerpo puede ejercer una respuesta inmune frente a las proteínas y péptidos terapéuticos. En algunos casos, esta respuesta inmune puede neutralizar la proteína e incluso provocar una reacción perjudicial en el receptor.
- VI. Para que una proteína sea fisiológicamente activa, se necesitan algunas modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación, fosforilación y escisión proteolítica. Estos requisitos pueden dictar el uso de tipos celulares específicos que son capaces de expresar y modificar las proteínas apropiadamente. De este modo, las proteínas recombinantes se pueden sintetizar en un tipo de células genéticamente modificadas para la producción a gran escala.
- VII. Los costos involucrados en el desarrollo de proteínas y péptidos terapéuticos son altos debido a las costosas tecnologías intermedias involucradas en su diseño (Leader et al., 2008; Mahato et al., 2003).

## **4.2 Vías de administración de proteínas.**

### **4.2.1. Vía parenteral.**

La administración parenteral se define como la administración a través de las vías en las que se usa una aguja, incluyendo inyecciones intravenosas (IV), intramusculares (IM), subcutáneas (SC) e intraperitoneales (IP) (Crommelin, 2013).

Sin embargo, la vía parenteral para la administración de péptidos y proteínas conlleva muchos inconvenientes debido a que es doloroso, no es muy bien tolerado por los pacientes además de que las proteínas son aclaradas rápidamente del torrente sanguíneo haciendo necesario la administración repetida del fármaco, lo cual puede conllevar efectos tóxicos (Almeida y Souto, 2007). La administración por vía subcutánea puede alcanzar una biodisponibilidad hasta del 100%, aunque puede ser mucho menor dependiendo de muchos factores, como el peso molecular, el lugar de la inyección, la actividad muscular y las condiciones patológicas (Crommelin et al., 2003). Generalmente la administración por vía parenteral es incómoda para los pacientes, además de ser costosa económicamente y puede causar además efectos secundarios indeseables. Por todo ello, los científicos han centrado sus esfuerzos en encontrar otras vías alternativas más efectivas, más fáciles y más seguras para la administración de péptidos y proteínas, y de este modo han surgido las vías no invasivas de administración de proteínas (Ibraheem et al., 2014).

### **4.2.2 Vías de administración no invasivas.**

Es necesario desarrollar métodos no invasivos para mejorar la satisfacción y el cumplimiento del paciente y superar las limitaciones asociadas con la administración basada en agujas. La administraciones oral, nasal, pulmonar, ocular, rectal y transdérmica son generalmente indoloras y más simples que las tecnologías de inyección tradicionales (Veisoh et al., 2014).

#### **4.2.2.1. Administración de proteínas por vía nasal.**

La administración nasal de proteínas se puede usar buscando tanto efectos sistémicos como efectos locales. Debido a las ventajas que presenta, ha ido incrementando su importancia como vía de administración. Estas ventajas derivan de la estructura anatómica de la nariz, la cual ayuda a aumentar la biodisponibilidad de las proteínas (Ibraheem et al., 2014; Zhang et al., 2012; Zheng et al., 2013):

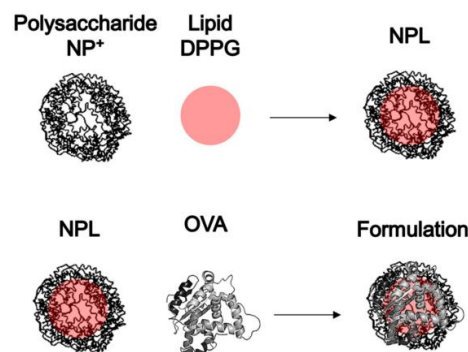
- El gran número de microvellosidades del epitelio nasal crea una gran superficie de absorción.
- La delgada y porosa membrana basal endotelial del epitelio nasal facilita y acelera la absorción de proteínas.
- Debido a que el epitelio nasal está muy vascularizado, la sangre del sistema venoso de la nariz pasa directamente a la circulación sistémica sin pasar por el hígado, por lo que se evita el efecto de primer paso hepático (Cao, 2016).
- Escasa actividad enzimática comparada con la del tracto gastrointestinal (Cao, 2016).
- La vía nasal no es dolorosa y no requiere instrumentación especial, por lo que es fácil su administración para los pacientes (Ritthidej, 2011).

Sin embargo, esta vía de administración tiene varios inconvenientes (Crommelin, 2013):

- Reproducibilidad (en particular bajo condiciones patológicas).
- Seguridad (por ejemplo, alteración del movimiento ciliar).
- Baja biodisponibilidad para proteínas.

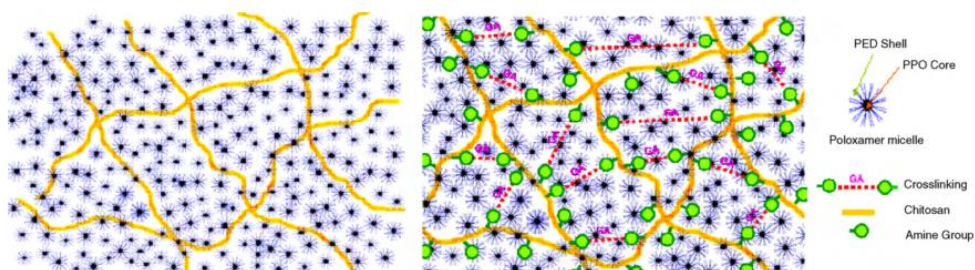
Como ejemplos de proteínas y péptidos administrados por vía nasal encontramos insulina, interferón, hormona liberadora de tiotropina, vasopresina, oxitocina, hormona liberadora de hormona luteinizante, sustancia P, glucagón o calcitonina (Ratnaparkhi et al., 2011).

Para superar las barreras citadas anteriormente, se han desarrollado mecanismos que permiten la liberación intranasal de proteínas usando nanopartículas lipídicas, especialmente para las vacunas mucosales. La liberación de proteínas dentro de la barrera epitelial es un punto clave para obtener una respuesta inmune, y el nanotransportador no debe mostrar toxicidad (Bernocchi et al., 2016). El proceso de formulación de la nanopartícula lipídica la podemos ver en la Figura 1.



**Fig. 1.** Representación de la formulación de la NPL con ovoalbúmina (OVA). La nanopartícula polisacáridica positiva (NP+) prefabricada se carga con un lípido aniónico para obtener la NPL. La proteína se carga en la NPL para preparar la formulación.

También se ha estudiado que la adición de iones de calcio a las mezclas de almidón/Carbopol® mejora la biodisponibilidad nasal de la insulina (Pringels et al., 2008), así como los efectos de la interpenetración de geles termosensibles mediante cross-linking en la liberación nasal de la insulina, demostrando su efecto beneficioso (Chung et al., 2010) (Figura 2).



**Fig. 2.** Diagramas esquemáticos propuestos de geles de (a) Poloxámero-Quitósán y (b) Poloxámero-Quitósán/Glutaraldehído cuyos polímeros de quitósán están entrelazados por el glutaraldehído e interpenetrado dentro de los geles.

Recientemente se experimentó si las nanopartículas con antígenos encapsulados modulan la respuesta inmune en una enfermedad autoinmune tras la aplicación en una vacuna nasal. La mejora de la tolerancia nasal inducida por las nanopartículas de PLGA fue suficiente para suprimir la artritis crónica y recidivante, lo que condujo a una reducción significativa de la enfermedad (Keijzer et al., 2011). También se probó el uso de nanopartículas de quitósán tiolado para mejorar la biodisponibilidad en la aplicación nasal del leuprolide, el cual se usa en el tratamiento del cáncer de próstata o de endometriosis (Shahnaz et al., 2012).

#### 4.2.2.2. Administración de proteínas por vía oral.

El Santo Grial de la administración de proteínas terapéuticas es todavía, sin duda, la administración vía oral. Ésta plantea un desafío considerable, pero también tiene un gran potencial (Moeller y Jorgensen, 2009).

La biodisponibilidad oral de las proteínas normalmente es menor del 1-2% (Carino y Mathiowitz, 1999; Pauletti et al., 1996). Esto es debido básicamente a que las enzimas gastrointestinales degradan las proteínas, además del hecho de que las proteínas tienen una penetración escasa a través de la membrana intestinal (Muheem et al., 2016; Renukuntla et al., 2013) debido a su gran tamaño y su carga negativa. A pesar de los problemas que se tienen que superar, esta vía

de administración es una alternativa interesante y atractiva a la liberación parenteral tradicional por su facilidad y conveniencia (Park et al., 2011). Sin embargo, es necesario superar los inconvenientes citados anteriormente, incrementando la permeabilidad de la membrana epitelial intestinal, inhibiendo las enzimas que degradan a las proteínas o protegiendo las proteínas terapéuticas mediante encapsulación (Li et al., 2013; Park et al., 2011; des Rieux et al., 2006). Cuando el medicamento debe ser usado repetidamente y constantemente, como la insulina, la vía oral está considerada como la vía de elección para los pacientes. Por esta razón, la insulina es la principal proteína que ha recibido más atención en relación a desarrollar una presentación oral (Chaturvedi et al., 2013; Mukhopadhyay et al., 2013).

Recientemente, se han desarrollado nanopartículas autoensambladas que son capaces de atravesar la capa mucosa y son absorbidas en la capa epitelial para administrar insulina por vía oral al inducir un cambio gradual de la estructura (Shan et al., 2015). Por otro lado, se probaron nanopartículas para el transporte de insulina que penetraban por transcitosis usando el receptor Fc neonatal (FcRn), lo cual provocó en ratones una respuesta hipoglucémica más prolongada comparada con la insulina libre administrada por vía intravenosa (Pridgen et al., 2013).

Se han desarrollado también varios transportadores de péptidos y proteínas para su administración por vía oral, como el tragacanto, un polisacárido aniónico (Nur et al., 2016).

#### **4.2.2.2.1. Administración vía colónica.**

La liberación colónica está siendo objeto de una profunda investigación como una aproximación prometedora para mejorar la biodisponibilidad oral de péptidos y proteínas (Maroni et al., 2013a; Maroni et al., 2013b).

Aunque el colon no es ideal para la absorción, puede ofrecer una serie de ventajas sobre el intestino delgado, incluyendo tiempo de tránsito prolongado, bajos niveles de peptidasas y buena capacidad de respuesta a los potenciadores de la penetración (Maroni et al., 2016; Park et al., 2011).

Como ejemplos de proteínas que pueden ser liberadas en el intestino grueso encontramos la prednisolona y la inulina, las cuales han sido preparadas como formulaciones con alginato cálcico con una cubierta de quitosán (Araujo et al., 2013).

En cuanto a la liberación colónica de la insulina, se probó su administración a través de nanopartículas basadas en polietileno con imina. El efecto sinérgico debido a la nanoformulación de la insulina y a la encapsulación en un pellet con triple capa dio como resultado un significativo y más duradero efecto hipoglucémico (Salvioni et al., 2016).

Además se han estudiado numerosas formas de liberación de la insulina para mejorar su biodisponibilidad por vía colónica, como las nanopartículas de alginato y quitosán sensibles al pH (Mukhopadhyay et al., 2015), las microemulsiones (Sharma et al., 2010), las cápsulas de recubrimiento entérico rellenas con nanopartículas de quitosán/poli ( $\gamma$ -ácido glutámico) liofilizado (Sonaje et al., 2010), las vesículas de Pluronic P85/poli (ácido láctico) (Xiong et al., 2013) o los liposomas biotinilados (Zhang et al., 2014).

Últimamente se están desarrollando sistemas dependientes del tiempo para la liberación de proteínas terapéuticas en el colon, como por ejemplo la liberación de insulina bovina desde un núcleo de fosfonato mesoporoso rodeado de una capa de glicocolato de sodio (Ren et al., 2013).

Actualmente también está ganando importancia un método de liberación colónica de forma que la activación sea llevada a cabo por la microflora colónica. Consiste en la aplicación de amilosa como material de revestimiento del sistema de liberación. La amilosa es un polisacárido de almidón de origen natural el cual es resistente a la  $\alpha$ -amilasa pancreática, pero es degradable por las enzimas bacterianas del colon (Yang, 2008).

#### **4.2.2.3. Administración de proteínas por vía pulmonar.**

Se ha prestado creciente atención al potencial de la vía pulmonar como una vía no invasiva para la administración sistémica de péptidos y proteínas. Los pulmones tienen varias características favorables, como una gran superficie de absorción, una membrana mucosa extremadamente fina y adecuado aporte sanguíneo. Además, se evita el efecto de primer paso hepático y la baja actividad enzimática presente limita el metabolismo de las proteínas administradas. La naturaleza no invasiva de esta vía hace que sea especialmente valiosa para la administración de proteínas de gran tamaño. Sin embargo, la administración pulmonar de péptidos y proteínas se complica por la complejidad de la estructura anatómica del sistema respiratorio humano, la membrana epitelial de las células de los capilares o la fagocitosis llevada a cabo por los macrófagos (Huang y Wang, 2006; Wan et al., 2012).

A continuación, se expone un listado de estrategias usadas para la administración de péptidos y proteínas a nivel pulmonar:

- Nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) como transportadores de proteínas terapéuticas como insulina (Liu et al., 2008) al epitelio pulmonar. Para resolver el problema derivado de que las nanopartículas escapan de la deposición en los pulmones se ha estudiado recientemente la

posibilidad de usar nanopartículas sólidas lipídicas microencapsuladas para la administración pulmonar de una proteína modelo, la papaína (Gaspar et al., 2017).

- Agregados de nanopartículas porosas (PNAPs) con un péptido modelo, el octreótido acetato, ya que son una excelente opción debido a su tamaño aerodinámico adecuado y su gran deposición (Yang et al., 2013).
- Micropartículas de zinc-alginato preparadas por spray-drying conteniendo la albúmina sérica bovina (BSA) como proteína modelo (Möbus et al., 2012).
- Microesferas de insulina conteniendo nanopartículas de quitosán (Al-Qadi et al., 2012).
- Microesferas porosas de poli-L-láctico cargadas con insulina preparadas en CO<sub>2</sub> supercrítico (Chen et al., 2015).

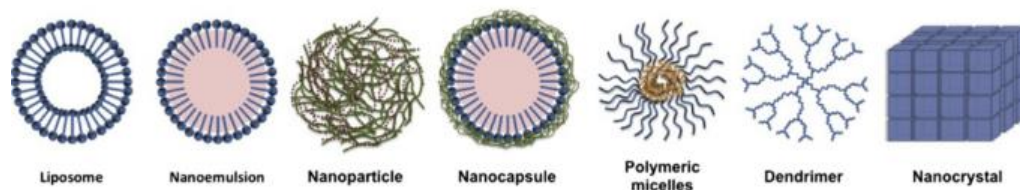
Otras proteínas terapéuticas que se han administrado por la vía pulmonar son, por ejemplo: calcitonina (Shan et al., 2014), Kv1.3-Blocking Peptide HsTX1[R14A] (Jin et al., 2016) y dornasa alfa (Hertel et al., 2015).

#### **4.2.2.4. Administración de proteínas por vía ocular.**

El ojo se considera una vía de administración altamente efectiva debido a sus singulares características (Vyas et al., 2011). Esta vía tiene muchas ventajas comparada con la vía parenteral como por ejemplo su fácil administración. Además, se evita el efecto de primer paso hepático e intestinal (Khafagy et al., 2007). Sin embargo, esta vía tiene también varios inconvenientes. Aunque aparentemente es muy accesible, el ojo está bien protegido contra la penetración de los fármacos por diferentes barreras, como la córnea, y algunos mecanismos como el parpadeo, el lagrimeo y el drenaje, los cuales producen una rápida eliminación de los fármacos de la superficie del ojo. Una gran desventaja de esta vía es su baja biodisponibilidad, que resulta principalmente del corto tiempo de retención en el área precorneal (Sánchez-López et al., 2016), además de la gran cantidad de enzimas presentes en el tejido ocular (Ibraheem et al., 2014). Aunque esta vía se puede usar para la administración sistémica y local, es esta última la de mayor uso (Vyas et al., 2011).

Para mejorar la biodisponibilidad de las proteínas por esta vía, se han desarrollado sistemas de liberación como las micelas poliméricas (Mandal et al., 2017) o los dendrímeros (Mignani et al., 2013) (Figura 3).





**Fig. 3.** Ilustración esquemática de la estructura de los diferentes tipos de nanotransportadores.

#### **4.2.2.5. Administración de proteínas por vía rectal.**

La vía rectal se puede utilizar cuando es necesaria la biodisponibilidad sistémica, ya que esta ruta evita el efecto de primer paso (Shah y Surti, 2011), existen bajos niveles de actividad proteasa, particularmente de origen pancreático y presenta una gran superficie, potenciada mediante el uso de agentes espumantes (Mackay et al., 1997). Sin embargo, esta vía tiene varias limitaciones como la baja absorción de péptidos y proteínas a través del epitelio rectal, dando lugar a una baja biodisponibilidad (De Boer et al., 1990). Además es una vía que no está muy bien aceptada por los pacientes (Yamamoto y Muranishi, 1997). Se ha demostrado que varios potenciadores de la absorción aumentan considerablemente la biodisponibilidad sistémica de fármacos peptídicos en la administración rectal (de Boer et al., 1992).

Recientemente se ha estudiado que la administración por vía rectal de un péptido de fusión reconstruido genéticamente del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) con un undecapéptido YGRKKRRQRRR ha conseguido una mejora de la demencia inducida por el péptido beta-amiloide A $\beta$  22-35 en ratones (Zhao et al., 2011).

#### **4.2.2.6. Administración de proteínas por vía transdérmica.**

La vía transdérmica tiene varias ventajas para la administración de proteínas, como por ejemplo fácil acceso, ausencia del efecto de primer paso hepático, eliminación de la formulación si es necesario o posibilidad de liberación sostenida o controlada.

Sin embargo, tiene el inconveniente de la baja biodisponibilidad de proteínas (Crommelin, 2013).

Existen varios métodos para conseguir que los péptidos y las proteínas atraviesen la piel, como por ejemplo la iontoforesis, y los que permiten la aplicación intradérmica de las vacunas, como inyección de chorro de líquido, microinyección, microagujas o microneedles (matrices), inyección de partículas de polvo e inyección de partículas de oro.

Con la iontoforesis se induce una corriente eléctrica transdérmica colocando dos electrodos en diferentes lugares de la piel. Esta corriente induce una migración de moléculas (ionizadas) a través de la piel. La penetración depende de la corriente, pH, fuerza iónica, peso molecular, carga de la proteína y temperatura. La proteína debe estar cargada en todo el espesor de la piel (el pH de la piel hidratada depende de la profundidad y varía entre pH 4 (superficie) y pH 7,3), lo que hace que las proteínas con valores punto isoeléctrico fuera de este rango sean los principales candidatos para el transporte iontoforético. No está claro si existen restricciones de tamaño (masa/carga de la proteína) para el transporte iontoforético. Sin embargo, sólo serán candidatas exitosas proteínas potentes. Con la tecnología actual, el flujo proteico a través de la piel está en el rango de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (Crommelin, 2013).

Recientemente se han estudiado unos parches con microagujas los cuales contienen unas vesículas sensibles a la hipoxia que proporcionan una liberación “inteligente” de insulina (Yu et al., 2015) y unas nanovarillas que son capaces de disminuir los niveles de glucosa sanguíneos por vía transdérmica mediante irradiación de luz infrarroja cercana en ratones diabéticos (Nose et al., 2012).

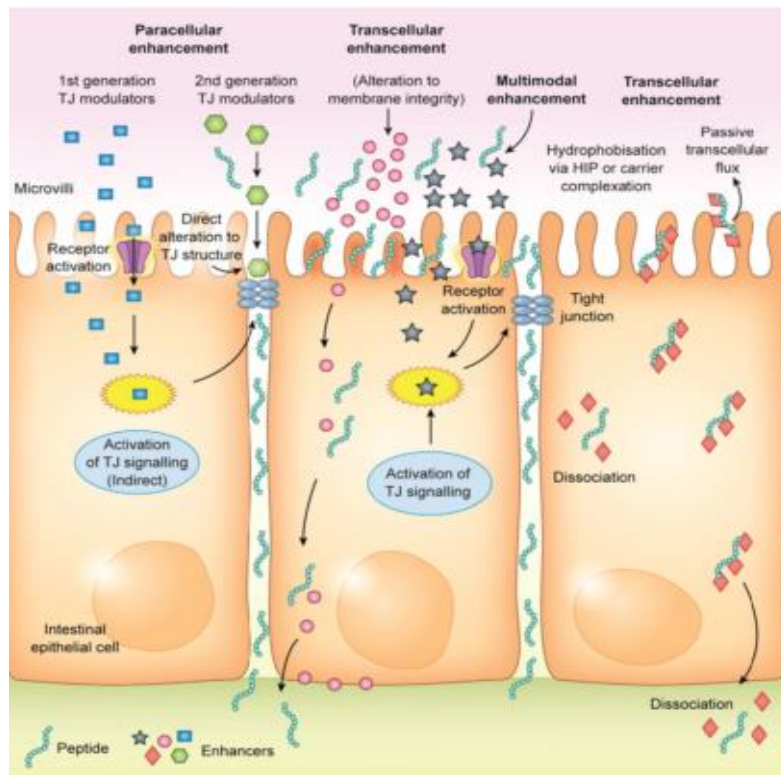
### **4.3 Estrategias usadas para mejorar la biodisponibilidad de péptidos y proteínas.**

Existen diferentes enfoques para aumentar la biodisponibilidad de los péptidos y proteínas terapéuticas, tales como el uso de potenciadores de la absorción, los inhibidores enzimáticos (Muheem et al., 2016), la modificación de la estructura proteica por conjugación con polímeros y la encapsulación.

#### **4.3.1. Potenciadores de la penetración.**

Los potenciadores de la penetración ofrecen una oportunidad para contrarrestar el problema de permeación de las proteínas terapéuticas debido a su gran tamaño, a la carga y a su hidrofilia. Los potenciadores de la penetración los podemos clasificar en 2 grandes grupos, los que potencian la penetración paracelular de proteínas y los que potencian la penetración transcelular (Maher et al., 2016) (Figura 4). Los potenciadores de la penetración paracelular están divididos a su vez en dos clases. Los de primera generación, que incrementan la permeabilidad intestinal actuando sobre las rutas de señalización de la célula relacionadas con la disolución de las uniones entre las células y los de segunda generación que actúan directamente en la alteración física de las uniones entre las células interfiriendo en las

interacciones homofílicas intercelulares. Los potenciadores de la penetración transcelular actúan por alteración de la integridad de la membrana de la célula o bien vía hidrofobización del péptido terapéutico objetivo.



**Fig. 4.** Tipos de potenciadores de la penetración

- Potenciadores de la penetración paracelular:
  - o Potenciadores que aparecen a partir del estudio de toxinas, como la citocalasina D.
  - o Potenciadores que se unen a las claudinas, como la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE).
  - o Potenciadores que tienen como objetivo la Cadherina E y el  $Ca^{2+}$ , como los quelantes EDTA y EGTA.
  - o Potenciadores que tienen como objetivo la ocludina.
- Potenciadores de la penetración transcelular:
  - o Potenciadores tensioactivos solubles:  $C_{10}$ , acil-carnitina, etoxilatos, alquil maltósidos y glucósidos, sales biliares y alquil sulfatos.

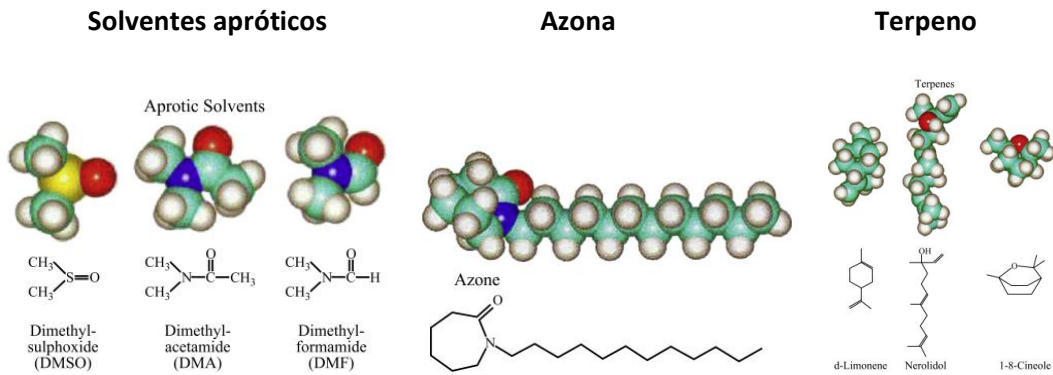
- Tensioactivos insolubles, como acil glicerol, Labrasol® y Gelucire® 44/14 y mezclas de lípidos como TPE®.
- Hidrofobización de péptidos, ya sea por alquilación, unión a conjugados de ácidos biliares, unión a iones hidrofóbicos o bien interacciones no iónicas. Podemos usar el Eligen®, el Bridgelock™, Macrosol™ y Axcress™.
- Potenciadores de la penetración no tensioactivos, como los salicilatos y enaminas, el quitosán (Caramella et al., 2010) y sus derivados, los CPPs (Cell penetrating peptides).

Se ha estudiado una estrategia basada en el uso de un péptido (CPP) no covalente que penetra en la célula para mejorar la liberación nasal del interferón beta y de su forma PEGilada (Iwase et al., 2016).

En la vía transdérmica también se han utilizado otros potenciadores de la penetración, que son productos químicos que interactúan con constituyentes de la piel para promover el flujo de fármaco. Deben tener varias características, como no ser tóxicos ni alergénicos, no deben tener actividad farmacológica en el cuerpo, deben funcionar unidireccionalmente, no deben causar alteraciones irreversibles en la piel, deben ser compatibles tanto con los fármacos como con los excipientes y deben ser bien aceptados para su aplicación en la piel. Los potenciadores de la penetración son numerosos y se pueden clasificar en varias categorías (Williams y Barry, 2012)(Figura 5):

- Agua.
- Sulfoxidos y similares, como el dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMAC), dimetilformamida (DMF) y decimetilsulfóxido (DCMS). Potencian la penetración por ejemplo de antivirales, antibióticos y esteroides.
- Azona, la cual fue la primera molécula sintetizada para actuar como potenciadora de la penetración.
- Pirrolidonas, como la N-metil-2-pirrolidona (NMP) y la 2-pirrolidona (2P).
- Ácidos grasos, como el ácido oleico, ácido caprílico y ácido cáprico.
- Alcoholes, alcoholes grasos y glicoles, como el etanol, el 1-butanol, el 1-octanol, el 1-propranolol y polietilenglicol.
- Tensioactivos, como el laurilsulfato sódico.
- Urea.

- Aceites esenciales, terpenos y terpenoides, como el aceite esencial de eucalipto, el de ylang-ylang, el de chenopodium, limoneno, nerolidol y cineol.
- Fosfolípidos, como la fosfatidilcolina.
- Solventes a altas concentraciones.



**Fig. 5.** Potenciadores de la penetración de la vía transdérmica.

Los mecanismos de potenciación de la penetración no están muy claros, pero hay varias opciones posibles (Williams y Barry, 2012):

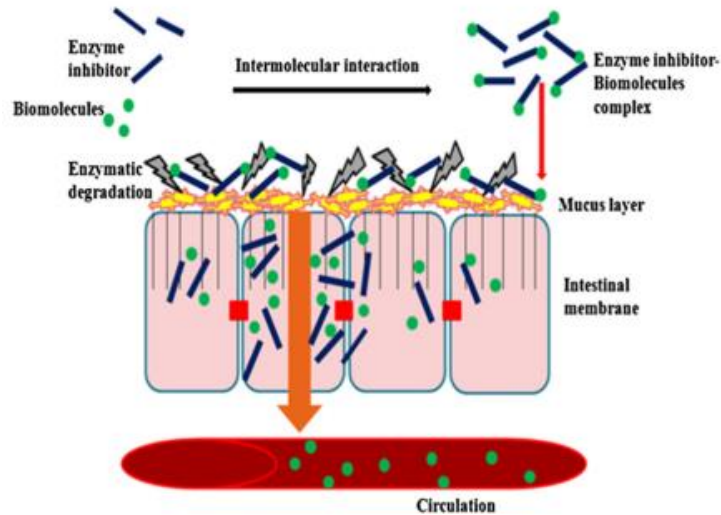
- I. Actuar sobre la queratina intracelular del estrato córneo, desnaturalizarla o modificar su conformación causando hinchamiento y aumento de la hidratación.
- II. Afectar a los desmosomas que mantienen la cohesión entre los corneocitos.
- III. Modificar los dominios lipídicos intercelulares para reducir la resistencia de la barrera de los lípidos de la bicapa.
- IV. Alterar la naturaleza disolvente del estrato córneo. El mecanismo de acción anterior se ha incluido dentro de un esquema general para explicar los efectos del potenciador sobre el estrato córneo, denominado teoría de partición de lípido-proteína; Los promotores pueden actuar alterando los lípidos y/o proteínas de la piel y/o afectando el comportamiento de partición. Además, el aumento de la penetración puede ser indirecto por:
  - i. Modificación de la actividad termodinámica del vehículo. La permeación rápida de un buen disolvente de la solución donante, tal como etanol, puede dejar al permeante en un estado más termodinámicamente activo que cuando el disolvente estaba presente, incluso hasta el punto de sobresaturación.

ii. Se ha sugerido que el disolvente que penetra a través de la membrana podría 'arrastrar' al permeante con él, aunque este concepto es algo polémico y aún no se ha probado.

iii. La solubilización del permeante en el donante (por ejemplo, con tensioactivos), especialmente cuando la solubilidad es muy baja como con los esteroides en soluciones donantes acuosas, puede reducir los efectos de agotamiento y prolongar la permeación del fármaco.

#### **4.3.2. Inhibidores enzimáticos.**

El uso de inhibidores enzimáticos da respuesta a la inestabilidad exhibida por las proteínas debido a un exceso de enzimas proteolíticas presentes en el tracto gastrointestinal que tienen funciones inherentes de digestión de proteínas en la dieta. La coadministración de inhibidores de proteasa puede disminuir la barrera enzimática y prevenir la degradación de proteínas y péptidos en el tracto gastrointestinal, facilitando así la absorción intestinal. Varios tipos de enzimas (endopeptidasas y exopeptidasas) son responsables de la escisión de las cadenas de aminoácidos (por ejemplo, tripsina, quimotripsina, elastasa, pepsina y carboxipeptidasas, etc.) en el sistema digestivo. Lo primero que se pensó fue el uso de inhibidores enzimáticos tales como inhibidores de tripsina de soja, mesilato de camóstato y cromostatina (Figura 6), así como inhibidores enzimáticos tales como aprotinina (inhibidor de tripsina/quimotripsina), amastatina, bestatina, boroleucina y puromicina (inhibidores de aminopeptidasa). Recientemente se ha descrito una nueva clase de inhibidores enzimáticos, ovomucoides de pollo y pato, que ofrecían protección al 100% contra la acción de tripsina y  $\alpha$ -quimotripsina para la insulina. En otro estudio, los inhibidores de proteasas conjugados con polímeros, tales como carboximetil celulosa-elastinal (CMC-Ela) han mostrado una protección *in vitro* contra las enzimas tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina y elastasa. Después de 4 horas de incubación, se encontró que casi el 33% de la proteína terapéutica era activa frente a la elastasa (Muheem et al., 2016; Renukuntla et al., 2013).



**Fig. 6.** Esquema del mecanismo de acción de los inhibidores enzimáticos

#### **4.3.3. Modificación de la estructura proteica por conjugación con polímeros.**

La conjugación con polímeros puede proporcionar varias ventajas a los fármacos enlazados modificando sustancialmente sus propiedades *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, puede: a) mejorar la solubilidad de fármacos, incluso los muy insolubles (por ejemplo paclitaxel), b) mejorar la biodisponibilidad del fármaco debido a la reducción del aclaramiento renal, consecuencia de un aumento en los volúmenes hidrodinámicos de conjugados, c) prevenir o reducir la agregación, la inmunogenicidad y la antigenicidad, y d) dirigirse específicamente a órganos, tejidos o células, utilizando polímeros dirigidos o explotando la "permeabilidad mejorada y efecto de retención" de los tejidos tumorales sólidos.

Los componentes mínimos de un conjugado polimérico son el propio polímero y el fármaco, ya sea una proteína o una molécula pequeña, aunque también puede estar presente un enlazador, que puede tener un papel determinante en el éxito o fracaso de todo el sistema (Grigoletto et al., 2016). El polietilenglicol (PEG) sigue siendo actualmente el mejor polímero disponible con el historial clínico más largo (Tabla 2). Sin embargo, tras años de investigación y desarrollo con este polímero se han puesto de manifiesto algunas de sus limitaciones, como la no degradabilidad e inmunogenicidad. Por ello se están realizando extensas investigaciones para desarrollar materiales alternativos en un esfuerzo por abordar estas limitaciones del PEG. Estas alternativas al PEG las podemos clasificar en (Qi y Chilkoti, 2015):

- No degradables: Poli(N-vinilpirrolidona) (PVP), Poliglicerol (PG), Poli(N-(2-hidroxipropil) metacrilamida) (PHPMA), Polioxazolinás (POZs).

- Degradables sintéticas:
  - o Basadas en PEG: poli[oligo(etilenglicol) metil metacrilato] (POEGMA).
  - o No basadas en PEG: poli(sulfobetaina metacrilato) (PSBMA) y poli(carboxibetaina metacrilato) (PCBMA).
- Degradables naturales:
  - o Polisacáridos: Dextrinas, ácido hialurónico (HA), ácido polisialico (PA), ácido colomínico (CA).
  - o Basados en poli(aminoácidos): Poli[N-(2- hidroxietil)-L-glutamina] (PHEG).
  - o Polipéptidos recombinantes: XTEN.
- Aquellos que tienen propiedades parecidas al PEG: polímeros catiónicos dendronizados poli(3,5-bis(3-amino-propoxi)benzil)-metacrilato (PG1) y conjugarlos con una endopeptidasa bacteriana específica de prolina.

Conjugate	Drug entity	Indication	Approval year/status	Ref.
PEG-Adenosine Deaminase (Adagen)	Protein	Severe Combined Immunodeficiency Disease (SCID)	1990	[97]
PEG-Asparaginase (Oncaspar)	Protein	Leukaemia	1994	[98]
Doxorubicin PEGylated liposome (Doxil)	Small drug	Ovarian cancer, AIDS-related Kaposi's Sarcoma, multiple myeloma	1995	[91]
PEG-Interferon- $\alpha$ 2b (PegIntron)	Protein	Hepatitis C	2000	[99]
PEG-Interferon- $\alpha$ 2a (Pegasys)	Protein	Hepatitis C	2001	[100]
PEG-Human growth hormone mutein antagonist (Somavert)	Protein	Acromegaly	2002	[101]
PEG-G-CSF (Neulasta)	Protein	Neutropenia	2002	[71]
PEG-anti-VEGF aptamer (Pegaptanib, Macugen)	Oligonucleotide	Wet age related macular degeneration	2004	[102]
PEG-Erythropoietin (Mircera)	Protein	Anaemia associated with chronic kidney disease	2007	[103]
PEG-anti-TNF Fab' (Cimzia)	Protein	Rheumatoid arthritis and Crohn's disease	2008	[104]
PEG-Uricase (Pegloticase; Krystexxa)	Protein	Chronic Gout	2010	[105]
Peginesatide (Omontys)	Peptide	Anaemia associated with chronic kidney disease	2012, withdrawn 2013	[106]
GlycoPEGylated G-CSF (lipegfilgrastim)	Protein	Neutropenia	2013	[107]
Peg-interferon beta 1a (Plegridy)	Protein	Relapsing Multiple Sclerosis	2014	[108]
PEG-Naloxone (Naloxegol)	Small drug	Opioid-Induced Constipation	2014	[109]
Pegylated recombinant coagulation factor VIII (Damoctocog alfa pegol; BAY94-9027)	Protein	Haemophilia, Haemorrhage	Phase III Haemophilia A; Phase II Haemorrhage	[110]
PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase (Pegvaliase)	Protein	Phenylketonuria	Phase III	[111]
Arginine deiminase replacements (Pegarginase)	Protein	Hepatocellular carcinoma	Phase III	[112]
GlycoPEGylated recombinant coagulation factor VIII (N8-GP)	Protein	Haemophilia A	Phase III	[113]
Pegylated Recombinant Factor IX (N9-GP)	Protein	Haemophilia B	Phase III	[114]
Pegylated haemoglobin (MP4, Hemospan)	Protein	Blood substitution	Phase III	[115]
PEGylated Recombinant Factor VIII (BAX855)	Protein	Haemophilia A	Phase IIIb	[116]
Pegylated-Proline-interferon alpha-2b (AOP2014)	Protein	Polycythemia Vera	Phase III	[117]
Pegylated-fibroblast growth factor-21 (BMS 986036)	Protein	Type 2 diabetes mellitus	Phase II	[118]
Peginterferon beta-1a	Protein	Multiple sclerosis	Phase IIIb	[119]
PEGylated recombinant human hyaluronidase	Protein	Pancreatic cancer	Phase III	[120]
PEG-SN38 (EZN-2208)	Small drug	Several cancers	Phase II for metastatic breast cancer	[121]
Etirinotecan pegol (NKTR-102)	Small drug	Several cancers	Phase III for metastatic breast cancer	[122]
PEG-polyglutamic-SN38 micelle (NK012)	Small drug	Several cancers	Phase II	[88]

**Tabla 2.** Conjugados terapéuticos PEGilados aprobados y algunos ejemplos de conjugados en fase II y III de ensayos clínicos.

#### 4.3.4. Encapsulación de proteínas: sistemas de liberación.

La encapsulación es una estrategia que puede utilizarse para aumentar la biodisponibilidad oral de macromoléculas como la insulina (Hecq et al., 2016).



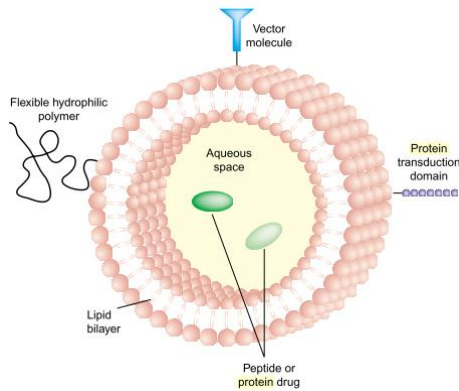
Estos sistemas de liberación proporcionan muchas ventajas, como la de proteger a las proteínas del efecto de las enzimas, además de controlar el lugar y la velocidad de la liberación de la proteína, lo cual evita efectos secundarios indeseados (Tan et al., 2010).

#### **4.3.4.1. Liposomas.**

Los liposomas son vesículas cerradas formadas por una bicapa lipídica que contienen un núcleo acuoso y se consideran el mejor tipo de nanopartículas orgánicas para el tratamiento de muchas enfermedades (Caracciolo, 2015). Los liposomas son sistemas portadores de fármacos muy versátiles, que pueden ser hechos a medida para transportar una gran variedad de fármacos para una amplia gama de terapias. Tanto los fármacos lipófilos como los hidrófilos pueden incorporarse en los liposomas, dentro de la bicapa de fosfolípidos y en el núcleo acuoso, respectivamente (Laouini et al., 2013). Estos sistemas de liberación son adecuados para el transporte de proteínas ya que son biocompatibles, inertes biológicamente, poco inmunogénicos, tienen poca toxicidad, tamaño adecuado y núcleo acuoso (Torchilin y Lukyanov, 2003). Las preparaciones liposomales pueden fabricarse utilizando una amplia variedad de métodos tales como hidratación de película delgada, evaporación en fase inversa, diálisis de detergente e inyección de disolvente (Laouini et al., 2013).

Los liposomas pueden tener una o dos membranas bicapa. El tamaño de la vesícula es un parámetro crítico que define la vida media de los liposomas, y el número y el tamaño de las bicapas afectan la cantidad de carga del fármaco en los liposomas. Además, en base a su tamaño y número de bicapas, los liposomas se agrupan en dos tipos: vesículas unilamelares y vesículas multilamelares (MLV).

Los liposomas no modificados son eliminados rápidamente por el sistema fagocítico mononuclear en la circulación sanguínea. Para superar este reto, la superficie de los liposomas se recubre con polietilenglicol (PEG) (Figura 7). La capa de polímero que rodea la parte externa del liposoma evita que se produzca un rápido aclaramiento por el sistema fagocítico mononuclear (Zununi Vahed et al., 2016).

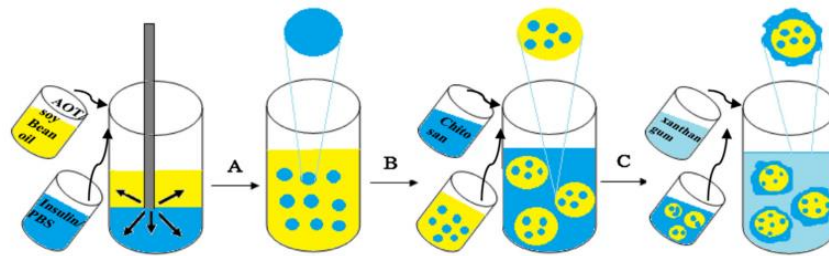


**Fig. 7.** Liposoma injertado con polímeros hidrofílicos (polietilenglicol) para aumentar su vida media en circulación.

Los liposomas se han utilizado en numerosas aplicaciones terapéuticas como vacunas o inmunoterapia localizada, provocando inmunidad antitumoral local y sistémica (Kwong et al., 2013). Se han usado recientemente liposomas con proteínas para el tratamiento de varias patologías, como el cáncer de vejiga (Vila-Caballer et al., 2016), tratamiento de las cicatrices hipertróficas con papaína (Chen et al., 2017), para la terapia de infecciones vaginales por el Virus del Papiloma Humano (VPH) con interferón alfa-2b (Wenche Jøraholmen et al., 2017), o para la disolución de los trombos mediante administración de Activador Tisular del Plasminógeno recombinante (Hsu y Chen, 2016).

#### 4.3.4.2. Emulsiones múltiples.

Las emulsiones simples del tipo O/A no resultan eficientes para el atrapamiento de fármacos hidrófilos como la insulina debido a la rápida disolución de los compuestos en la fase continua acuosa. El problema de la encapsulación eficiente de fármacos hidrófilos puede resolverse usando la técnica de emulsión múltiple. El método de emulsión múltiple es relativamente simple (Figura 8) y puede encapsular eficientemente compuestos altamente solubles en agua incluyendo proteínas y péptidos como la insulina. Se sabe que uno de los tensioactivos estabilizantes requeridos tiene que ser con HLB bajo para formar la emulsión primaria de agua en aceite (A/O) y el otro tiene que ser con HLB más alto para conseguir emulsificación secundaria (Mutaliyeva et al., 2016).



**Fig. 8.** Procedimiento de encapsulación de fármacos hidrofílicos: A) Emulsificación B) Re-emulsificación de la emulsión primaria para producir una emulsión múltiple. C) Adición de goma xantana para estabilizar las gotículas de la emulsión múltiple con capas de biopolímeros.

Se han propuesto emulsiones múltiples de agua en aceite en agua (A1/O/A2) en aplicaciones farmacéuticas y alimentarias para la encapsulación, protección y liberación de bacterias probióticas, nutrientes solubles en agua sensibles (minerales o vitaminas), o compuestos bioactivos.

La capacidad de una emulsión doble para servir como herramienta de encapsulación depende de la estabilidad de la emulsión, que se determina por la naturaleza de la fase oleosa, el tipo de emulsionantes y la naturaleza de los materiales atrapados (Giroux et al., 2016).

#### 4.3.4.3. Nanopartículas poliméricas.

En la liberación de proteínas, la tecnología de las nanopartículas permite: i) proteger las proteínas contra la degradación o desnaturalización prematura en el ambiente biológico; ii) mejorar la semivida de eliminación de proteínas con propiedades farmacocinéticas deficientes; iii) controlar la liberación mantenida y/o ajustable que puede mantener la concentración de fármaco en el intervalo terapéutico; y iv) dirigir a tejidos, células y compartimentos intracelulares alterados, mejorando así la seguridad y eficacia de las proteínas terapéuticas (Peer et al., 2007).

Entre las nanopartículas, las nanopartículas basadas en proteínas (PBN) tienen interés especial debido a que son biodegradables, metabolizables, pueden manipularse fácilmente y existen varias posibilidades de alteración y/o modificación de la superficie para la fijación covalente de fármacos. Las proteínas usadas en la elaboración de estas PBN son, por ejemplo, caseína, albúmina o colágeno (Tarhini et al., 2017).

Las nanopartículas poliméricas pueden ser administradas por varias vías. Como ejemplos de nanopartículas poliméricas para la liberación de proteínas y péptidos a nivel pulmonar, encontramos:

- Nanopartículas poliméricas PGA-co-PDL catiónicas (NPs) conteniendo una proteína modelo, la albúmina sérica bovina (BSA) (Kunda et al., 2015).
- Nanosistemas híbridos basados en polímeros naturales, como las nanopartículas de quitosán/carragenano/tripolifosfato (Rodrigues et al., 2015).

#### **4.3.4.4. Nanopartículas sólidas lipídicas (SLN).**

Las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) son consideradas como uno de los sistemas de administración de fármacos basados en la nanotecnología. Las SLNs están generalmente compuestas de lípidos sólidos y tensioactivo(s). Los lípidos, principal ingrediente de los SLNs, afectan al atrapamiento del fármaco, la estabilidad de los SLNs y el comportamiento de liberación prolongada de las formulaciones desarrolladas. Pueden usarse diferentes tipos de lípidos tales como ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos y glicéridos. Las ceras también se han reportado en la fabricación de SLNs.

Los tensioactivos juegan un papel importante en la dispersión del lípido fundido en la fase acuosa durante la formulación y estabilizan las nanopartículas lipídicas durante el almacenamiento (Elbahwy et al., 2017).

Sus potenciales ventajas, tales como la posibilidad de prolongar la liberación del fármaco y el direccionamiento activo, el aumento de la biodisponibilidad, la posibilidad de encapsular fármacos lipófilos e hidrófilos, la escasa toxicidad, la protección de la biomolécula frente a la degradación gastrointestinal, y su biodegradabilidad y biocompatibilidad, han atraído a muchos investigadores que exploran el posible uso de SLNs como sistemas de administración de fármacos (Elbahwy et al., 2017). También tienen propiedades adhesivas, inherentes a su tamaño nano y su subsiguiente alta área específica, y aumentan el transporte a través de la mucosa. Otras ventajas de las nanopartículas cuando se administran por vía oral son el transporte paracelular y el transporte transcelular, no sólo a través de las placas de Peyer, sino también a través de los enterocitos.

Las SLN pueden desarrollarse por distintas técnicas, algunas de las cuales conllevan el uso de disolventes orgánicos. Los disolventes orgánicos se emplean para disolver los lípidos sólidos formando una emulsión líquida y, posteriormente, se evaporan para obtener SLNs. La técnica

no basada en disolvente utiliza alta energía como homogeneizadores de alta presión para dispersar el lípido fundido en la fase acuosa. Los métodos que no utilizan disolventes se prefieren generalmente sobre los basados en disolventes debido al bajo coste de producción y a la falta de citotoxicidad asociada con el solvente orgánico (Elbahwy et al., 2017).

La denominada técnica de doble emulsión agua-en-aceite-en-agua (A/O/A), la cual usa un disolvente orgánico para incluir los lípidos, fue preferida a la basada en la fusión de lípidos para producir SLNs (Hecq et al., 2016).

Sin embargo, un inconveniente importante parecía comprometer la futura aplicación de la SLN, la baja carga de fármaco. Nuevas investigaciones sobre la formulación ayudaron en la mejora de los SLNs. Se encontró que la incorporación de un lípido líquido a la matriz sólida de la nanopartícula aumentaba el número de imperfecciones en la matriz sólida del núcleo, facilitando así la incorporación de una mayor cantidad de fármaco, preservando al mismo tiempo la estabilidad física de estos nanotransportadores. Esta nueva nanopartícula sólida lipídica de segunda generación se denominó Nanostructured Lipid Carriers (NLC). Los NLC consisten en una matriz lipídica sólida no estructurada hecha de una mezcla de lípidos sólidos y líquidos mezclados y una fase acuosa que contiene un tensioactivo o una mezcla de tensioactivos (Beloqui et al., 2016).

Estos sistemas de liberación se han usado en varias aplicaciones con fármacos proteicos, como en la liberación de proteínas en el cerebro tras su administración intranasal para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Gartziandía et al., 2015) o para la liberación intranasal de factor de crecimiento fibroblástico básico en ratas hemiparkinsonianas (Zhao et al., 2014).

Para evitar el primer paso hepático y potenciar tanto la bioadhesión como la biodisponibilidad oral de la insulina, se ha estudiado la encapsulación en nanopartículas de lípidos catiónicos sólidos (cSLNs). De hecho, los lípidos catiónicos se han seleccionado para obtener interacciones iónicas entre la superficie cargada positivamente de las cSLN y las cargas negativas presentes en el moco en la superficie del tracto intestinal. Además, debido a la repulsión electrostática, las cargas positivas de las cSLN ofrecen el beneficio de estabilizar la nanosuspensión. Esto evita problemas de agregación, especialmente en un ambiente ácido (por ejemplo, el jugo gástrico). Dicha estabilidad en el tracto gastrointestinal es esencial para preservar las propiedades ventajosas de las cSLN.

## 5. CONCLUSIONES.

Las proteínas y péptidos terapéuticos desempeñan un papel fundamental en el tratamiento de numerosas enfermedades crónicas y graves debido a las ventajas que presentan, como, por ejemplo, la alta tasa de éxito en ensayos clínicos en comparación con los productos farmacéuticos tradicionales. Por ello, se ha centrado mucha atención en las posibles vías de administración y en las estrategias usadas para mejorar su biodisponibilidad.

En cuanto a las vías de administración, aunque la vía parenteral es la más usada actualmente, la ruta más interesante por su comodidad es la vía oral. Sin embargo, esta ruta presenta todavía algunos inconvenientes, como la baja biodisponibilidad oral de las proteínas administradas. La liberación colónica se presenta como una alternativa muy prometedora a la absorción en el intestino delgado por el aumento del tiempo de tránsito y los bajos niveles de peptidasas. Entre otras vías no invasivas destacan la nasal y la pulmonar por demostrar una gran biodisponibilidad gracias a sus estructuras anatómicas, y la vía transdérmica, que permite la liberación prolongada del fármaco, con gran potencial para su uso en patología crónicas.

Para mejorar la biodisponibilidad de las proteínas y péptidos terapéuticos a través de las distintas vías se están desarrollando múltiples estrategias. Los primeros enfoques que surgieron fueron los potenciadores de la penetración, que transportan las proteínas a través del epitelio sin afectar a su solubilidad, y los inhibidores enzimáticos, que impiden la acción de las proteasas presentes en el intestino. Por su parte, la modificación de la estructura proteica por conjugación de polímeros, como PEG, aumenta la semivida de eliminación al disminuir el aclaramiento renal, disminuye la inmunogenicidad y la antigenicidad y permite el *targeting* activo de las proteínas. Entre las estrategias más investigadas está la encapsulación de proteínas utilizando liposomas, por su gran versatilidad; emulsiones múltiples, que solucionan las limitaciones de las emulsiones simples; y nanopartículas tanto poliméricas como lipídicas. Estas últimas son las de mayor importancia debido fundamentalmente a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad.

En conclusión, aunque las rutas no invasivas presentan todavía muchos problemas y desafíos que hay que superar, ofrecen un gran potencial y se espera que veamos en un futuro próximo que estas rutas complementen a la vía parenteral para administrar proteínas y péptidos, gracias a las distintas estrategias que se están desarrollando actualmente.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

Al-Qadi S, Grenha A, Carrión-Recio D, Seijo B, Remuñán-López C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations. *J. Control. Release.* Elsevier B.V. 2012; 157(3): 383-90.

Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007; 59(6): 478-90.

Antosova Z, Mackova M, Kral V, Macek T. Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever? *Trends Biotechnol.* 2009; 27(11): 628-35.

Araujo V, Gamboa A, Caro N, Abugoch L, Gotteland M, Valenzuela F, et al. Release of Prednisolone and Inulin from a New Calcium-Alginate Chitosan-Coated Matrix System for Colonic Delivery. *J. Pharm. Sci.* 2013; 102(8): 2748-59.

Beloqui A, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A, Almeida AJ, Prétat V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* Elsevier Inc. 2016; 12(1): 143-61.

Bernocchi B, Carpentier R, Lantier I, Ducournau C, Dimier-Poisson I, Betbeder D. Mechanisms allowing protein delivery in nasal mucosa using NPL nanoparticles. *J. Control. Release.* 2016; 232: 42-50.

de Boer AG, van Hoogdalem EJ, Breimer DD. (D) Routes of delivery: Case studies: (4) Rate-controlled rectal peptide drug absorption enhancement. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1992; 8(2-3): 237-51.

De Boer AG, van Hoogdalem EJ, Heijligers-Feijen CD, Verhoef J, Breimer DD. Rectal absorption enhancement of peptide drugs. *J. Control. Release.* 1990; 13(2-3): 241-6.

Camenisch G, Alsenz J, Van De Waterbeemd H, Folkers G. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1998; 6(4): 313-9.

Cao C. *Advances in Delivering Protein and Peptide Therapeutics.* 2016; 18-20.

Caracciolo G. Liposome-protein corona in a physiological environment: Challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* Elsevier Inc. 2015; 11(3): 543-57.

Caramella C, Ferrari F, Bonferoni MC, Rossi S, Sandri G. Chitosan and its derivatives as drug penetration enhancers. *J. Drug Deliv. Sci. Technol. Elsevier Masson SAS.* 2010; 20(1): 5-13.

Carino GPG, Mathiowitz E. Oral insulin delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999; 35(2-3): 249-57.

Cázares-Delgadillo J, Ganem-Rondero A, Kalia YN. Human growth hormone: New delivery systems, alternative routes of administration, and their pharmacological relevance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011; 78(2): 278-88.

Chaturvedi K, Ganguly K, Nadagouda MN, Aminabhavi TM. Polymeric hydrogels for oral insulin delivery. *J. Control. Release. Elsevier B.V.* 2013; 165(2): 129-38.

Chen AZ, Tang N, Wang S Bin, Kang YQ, Song HF. Insulin-loaded poly-l-lactide porous microspheres prepared in supercritical CO<sub>2</sub> for pulmonary drug delivery. *J. Supercrit. Fluids. Elsevier B.V.* 2015; 101: 117-23.

Chen Y-Y, Lu Y-H, Ma C-H, Tao W-W, Zhu J-J, Zhang X. A novel elastic liposome for skin delivery of papain and its application on hypertrophic scar. *Biomed. Pharmacother. Elsevier Masson SAS.* 2017; 87: 82-91.

Chung T-W, Liu D-Z, Yang J-S. Effects of interpenetration of thermo-sensitive gels by crosslinking of chitosan on nasal delivery of insulin: In vitro characterization and in vivo study. *Carbohydr. Polym.* 2010; 82(2): 316-22.

Chura-Chambi RM, Nakajima E, de Carvalho RR, Miyasato PA, Oliveira SC, Morganti L, et al. Refolding of the recombinant protein Sm29, a step toward the production of the vaccine candidate against schistosomiasis. *J. Biotechnol. Elsevier B.V.* 2013; 168(4): 511-9.

Crommelin DJA. Formulation of Biotech Products, Including Biopharmaceutical Considerations. En: Crommelin DJA, editor. *Pharm. Biotechnol.* 4<sup>a</sup> ed. New York: Springer; 2013. p. 69-100.

Crommelin DJA, Storm G, Verrijck R, De Leede L, Jiskoot W, Hennink WE. Shifting paradigms: Biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs. *Int. J. Pharm.* 2003; 266(1-2): 3-16.

Elbahwy IA, Ibrahim HM, Ismael HR, Kasem AA. Journal of Drug Delivery Science and Technology Enhancing bioavailability and controlling the release of glibenclamide from optimized solid lipid nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol. Elsevier Ltd.* 2017; 38: 78-89.

Gartziandia O, Herran E, Pedraz JL, Carro E, Igartua M, Hernandez RM. Chitosan coated nanostructured lipid carriers for brain delivery of proteins by intranasal administration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces. Elsevier B.V.* 2015; 134: 304-13.



Gaspar DP, Serra C, Lino PR, Gonçalves L, Taboada P, Remuñán-López C, et al. Microencapsulated SLN: An innovative strategy for pulmonary protein delivery. *Int. J. Pharm.* Elsevier B.V. 2017; 516(1-2): 231-46.

Giroux HJ, Robitaille G, Britten M. Controlled release of casein-derived peptides in the gastrointestinal environment by encapsulation in water-in-oil-in-water double emulsions. *LWT - Food Sci. Technol.* 2016; 69: 225-32.

Grigoletto A, Maso K, Mero A, Rosato A, Schiavon O, Pasut G. Drug and protein delivery by polymer conjugation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* Elsevier Ltd. 2016; 32: 132-41.

Hecq J, Amighi K, Goole J. Development and evaluation of insulin-loaded cationic solid lipid nanoparticles for oral delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* Elsevier Ltd. 2016; 36: 192-200.

Hertel SP, Winter G, Friess W. Protein stability in pulmonary drug delivery via nebulization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Elsevier B.V. 2015; 93: 79-94.

Hsu H-L, Chen J-P. Preparation of thermosensitive magnetic liposome encapsulated recombinant tissue plasminogen activator for targeted thrombolysis. *J. Magn. Magn. Mater.* Elsevier. 2016; 427: 188-194.

Huang YY, Wang CH. Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. *J. Control. Release.* 2006; 113(1): 9-14.

Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Administration strategies for proteins and peptides. *Int. J. Pharm.* Elsevier B.V. 2014; 477(1-2): 578-89.

Iwase Y, Kamei N, Khafagy ES, Miyamoto M, Takeda-Morishita M. Use of a non-covalent cell-penetrating peptide strategy to enhance the nasal delivery of interferon beta and its PEGylated form. *Int. J. Pharm.* 2016; 510(1): 304-10.

Jin L, Zhou Q (Tony), Chan H-K, Larson IC, Pennington MW, Morales RAV, et al. Pulmonary Delivery of the Kv1.3-Blocking Peptide HsTX1[R14A] for the Treatment of Autoimmune Diseases. *J. Pharm. Sci.* 2016; 105(2): 650-6.

Keijzer C, Slütter B, van der Zee R, Jiskoot W, van Eden W, Broere F. PLGA, PLGA-TMC and TMC-TPP nanoparticles differentially modulate the outcome of nasal vaccination by inducing tolerance or enhancing humoral immunity. *PLoS One.* 2011; 6(11): 1-10.

Khafagy E-S, Morishita M, Onuki Y, Takayama K. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007; 59(15): 1521-46.

Kunda NK, Alfagih IM, Dennison SR, Somavarapu S, Merchant Z, Hutcheon GA, et al. Dry powder pulmonary delivery of cationic PGA-co-PDL nanoparticles with surface adsorbed model protein. *Int. J. Pharm.* Elsevier B.V. 2015; 492(1-2): 213-22.

Kwong B, Gai SA, Elkhader J, Wittrup KD, Darrell J. IL-2 prevents lethal toxicity and elicits local and systemic anti-tumor immunity. 2013; 73(5): 1547-58.

Lakshmaiah Narayana J, Chen JY. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. *Peptides*. Elsevier Inc. 2015; 72: 88-94.

Laouini A, Charcosset C, Fessi H, Holdich RG, Vladisavljević GT. Preparation of liposomes: A novel application of microengineered membranes-From laboratory scale to large scale. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2013; 112: 272-8.

Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008; 7(1): 21-39.

Li X, Guo S, Zhu C, Zhu Q, Gan Y, Rantanen J, et al. Intestinal mucosa permeability following oral insulin delivery using core shell corona nanolipoparticles. *Biomaterials*. Elsevier Ltd. 2013; 34(37): 9678-87.

Liu J, Gong T, Fu H, Wang C, Wang X, Chen Q, et al. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *Int. J. Pharm.* 2008; 356(1-2): 333-44.

Mackay M, Phillips J, Hastewell J. Peptide drug delivery: Colonic and rectal absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997; 28(2): 253-73.

Maher S, Mrsny RJ, Brayden DJ. Intestinal permeation enhancers for oral peptide delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Elsevier B.V. 2016; 106: 277-319.

Mandal A, Bisht R, Rupenthal ID, Mitra AK. Polymeric micelles for ocular drug delivery: From structural frameworks to recent preclinical studies. *J. Control. Release*. Elsevier B.V. 2017; 248: 96-116.

Maroni A, Del Curto MD, Salmaso S, Zema L, Melocchi A, Caliceti P, et al. In vitro and in vivo evaluation of an oral multiple-unit formulation for colonic delivery of insulin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* Elsevier B.V. 2016; 108: 76-82.

Maroni A, Del Curto MD, Zema L, Foppoli A, Gazzaniga A. Film coatings for oral colon delivery. *Int. J. Pharm.* Elsevier B.V. 2013a; 457(2): 372-94.

Maroni A, Zema L, Loreti G, Palugan L, Gazzaniga A. Film coatings for oral pulsatile release. *Int. J. Pharm.* Elsevier B.V. 2013b; 457(2): 362-71.

Mignani S, El Kazzouli S, Bousmina M, Majoral JP. Expand classical drug administration ways by emerging routes using dendrimer drug delivery systems: A concise overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Elsevier B.V. 2013; 65(10): 1316-30.

Möbus K, Siepmann J, Bodmeier R. Zinc-alginate microparticles for controlled pulmonary delivery of proteins prepared by spray-drying. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012; 81(1): 121-30.

Moeller EH, Jorgensen L. Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals. *Drug Discov. Today Technol.* 2009; 5(2-3): 89-94.

Muheem A, Shakeel F, Jahangir MA, Anwar M, Mallick N, Jain GK, et al. A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. *Saudi Pharm. J. King Saud University.* 2016; 24(4): 413-28.

Mukhopadhyay P, Chakraborty S, Bhattacharya S, Mishra R, Kundu PP. PH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* Elsevier B.V. 2015; 72: 640-8.

Mukhopadhyay P, Sarkar K, Chakraborty M, Bhattacharya S, Mishra R, Kundu PP. Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo studies in diabetic animal model. *Mater. Sci. Eng. C.* Elsevier B.V. 2013; 33(1): 376-82.

Mutaliyeva B, Grigoriev D, Madybekova G, Sharipova A, Aidarova S, Saparbekova A, et al. Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* Elsevier B.V.; 2016. 1-6.

Nishida T, Inui M, Nomizu M. Peptide therapies for ocular surface disturbances based on fibronectin-integrin interactions. *Prog. Retin. Eye Res.* Elsevier Ltd. 2015; 47: 38-63.

Nordström R, Malmsten M. Delivery systems for antimicrobial peptides. *Adv. Colloid Interface Sci.* Elsevier B.V. 2017; 242: 17-34.

Nose K, Pissuwan D, Goto M, Katayama Y, Niidome T. Gold nanorods in an oil-base formulation for transdermal treatment of type 1 diabetes in mice. *Nanoscale.* 2012; 4(12): 3776-80.

Nur M, Ramchandran L, Vasiljevic T. Tragacanth as an oral peptide and protein delivery carrier: Characterization and mucoadhesion. *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd. 2016; 143: 223-30.

Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov. Today*. Elsevier Ltd. 2014; 19(5): 590-601.

Park K, Kwon IC, Park K. Oral protein delivery: Current status and future prospect. *React. Funct. Polym.* Elsevier Ltd. 2011; 71(3): 280-7.

Pauletti GM, Gangwar S, Knipp GT, Nerurkar MM, Okumu FW, Tamura K, et al. Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs. *J. Control. Release*. 1996; 41(1-2): 3-17.

Peer D, Hong S, Farokhzad OC. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. 2007; 2: 751-60.

Pridgen EM, Alexis F, Kuo TT, Levy-Nissenbaum E, Karnik R, Blumberg RS, et al. Transepithelial Transport of Fc -Targeted Nanoparticles by the Neonatal Fc Receptor for Oral Delivery. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(213): 167-213

Pringels E, Vervaet C, Verbeeck R, Foreman P, Remon JP. The addition of calcium ions to starch/Carbopol® mixtures enhances the nasal bioavailability of insulin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008; 68(2): 201-6.

Qi Y, Chilkoti A. Protein-polymer conjugation-moving beyond PEGylation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* Elsevier Ltd. 2015; 28: 181-93.

Ratnaparkhi MP, Chaudhari SP, Pandya V a. Peptides and proteins in pharmaceuticals. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 2011; 3(2): 1-9.

Ren Y, Shi X, Sun Q, Sun L. Dual-controlled oral colon-targeted delivery of bovine insulin based on mesoporous phosphonate. *Mater. Res. Bull.* Elsevier Ltd. 2013; 48(11): 4850-5.

Renukuntla J, Vadlapudi AD, Patel A, Boddu SHS, Mitra AK. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *Int. J. Pharm.* Elsevier B.V. 2013; 447(1-2): 75-93.

des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Pr at V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J. Control. Release*. 2006; 116(1): 1-27.

Ritthidej GC. Nasal delivery of peptides and proteins with chitosan and related mucoadhesive polymers. *Pept. Protein Deliv.* 2011; 47-68.

Rodgers KR, Chou RC. Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions. *Biotechnol. Adv.* Elsevier Inc. 2016; 34(6): 1149-58.

Rodrigues S, Cordeiro C, Seijo B, Remuñán-López C, Grenha A. Hybrid nanosystems based on natural polymers as protein carriers for respiratory delivery: Stability and toxicological evaluation. *Carbohydr. Polym.* 2015; 123: 369-80.

Rubinstein, A. Approaches and opportunities in colon specific drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Car. Sys.* 1995; 12: 101–149.

Salvioni L, Fiandra L, Del Curto MD, Mazzucchelli S, Allevi R, Truffi M, et al. Oral delivery of insulin via polyethylene imine-based nanoparticles for colonic release allows glycemic control in diabetic rats. *Pharmacol. Res. Elsevier Ltd.* 2016; 110: 122-30.

Sánchez-López E, Espina M, Doktorovova S, Souto EB, García ML. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part I - Barriers and determining factors in ocular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2016; 110: 70-5.

Shah B, Surti N. 12 – Other Routes of Protein and Peptide Delivery: Transdermal, Topical, Uterine, and Rectal. *Challenges Deliv. Ther. Genomics Proteomics.* 2011; 623-71.

Shahnaz G, Vetter A, Barthelmes J, Rahmat D, Laffleur F, Iqbal J, et al. Thiolated chitosan nanoparticles for the nasal administration of leuprolide: Bioavailability and pharmacokinetic characterization. *Int. J. Pharm.* 2012; 428(1-2): 164-70.

Shan W, Zhu X, Liu M, Li L, Zhong J, Sun W, et al. Overcoming the Diffusion Barrier of Mucus and Absorption Barrier of Epithelium by Self-Assembled Nanoparticles for Oral Delivery of Insulin. *ACS Nano. American Chemical Societ.* 2015; 9(3): 2345-56.

Shan Z, Tan Y, Qin L, Li G, Pan X, Wang Z, et al. Formulation and evaluation of novel reverse microemulsions containing salmon calcitonin in hydrofluoroalkane propellants. *Int. J. Pharm.* 2014; 466(1-2): 390-9.

Sharma G, Wilson K, van der Walle CF, Sattar N, Petrie JR, Ravi Kumar MNV. Microemulsions for oral delivery of insulin: Design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010; 76(2): 159-69.

Sonaje K, Chen YJ, Chen HL, Wey SP, Juang JH, Nguyen HN, et al. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials. Elsevier Ltd.* 2010; 31(12): 3384-94.

Swiech K, Picanço-Castro V, Covas DT. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr. Purif. Elsevier Inc.* 2012; 84(1): 147-53.

Tan ML, Choong PFM, Dass CR. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*. 2010; 31(1): 184-93.

Tarhini M, Greige-gerges H, Elaissari A. Protein-based nanoparticles : From preparation to encapsulation of active molecules. 2017; 522: 172-97.

Torchilin VP, Lukyanov AN. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: Challenges and solutions. *Drug Discov. Today*. 2003; 8(6): 259-66.

Van den, M.G., Kinget. R. Oral colon-specific drug delivery: a review. *Drug Delivery*, 1995; 2: 81–93.

Veisheh O, Tang BC, Whitehead KA, Anderson DG, Langer R. Managing diabetes with nanomedicine : *Nat. Publ. Gr. Nature Publishing Group*. 2014; 14(1): 45-57.

Vila-Caballer M, Codolo G, Munari F, Malfanti A, Fassan M, Ruge M, et al. A pH-sensitive stearyl-PEG-poly(methacryloyl sulfadimethoxine)-decorated liposome system for protein delivery: An application for bladder cancer treatment. *J. Control. Release. Elsevier B.V.* 2016; 238: 31-42.

Vyas SP, Paliwal R, Paliwal SR. Chapter 5 – Ocular Delivery of Peptides and Proteins. *Pept. Protein Deliv.* 2011; 87-103.

Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotech. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.* 2010; 28(9): 917-24.

Wan F, Møller EH, Yang M, Jørgensen L. Formulation technologies to overcome unfavorable properties of peptides and proteins for pulmonary delivery. *Drug Discov. Today Technol. Elsevier Ltd.* 2012; 9(2): 141-6.

Wenche Jøraholmen M, Basnet P, Acharya G, Škalko-Basnet N. PEGylated liposomes for topical vaginal therapy improve delivery of interferon alpha. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Elsevier B.V.* 2017; 113: 132-9.

Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev. Elsevier B.V.* 2012; 64(SUPPL.): 128-37.

Xiong XY, Li QH, Li YP, Guo L, Li ZL, Gong YC. Pluronic P85/poly(lactic acid) vesicles as novel carrier for oral insulin delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces. Elsevier B.V.;* 2013; 111: 282-8.

Yamamoto A, Muranishi S. Rectal drug delivery systems improvement of rectal peptide absorption by absorption enhancers, protease inhibitors and chemical modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997; 28(2): 275-99.

Yang L. Biorelevant dissolution testing of colon-specific delivery systems activated by colonic microflora. *J. Control. Release.* 2008; 125(2): 77-86.

Yang L, Luo J, Shi S, Zhang Q, Sun X, Zhang Z, et al. Development of a pulmonary peptide delivery system using porous nanoparticle-aggregate particles for systemic application. *Int. J. Pharm. Elsevier B.V.* 2013; 451(1-2): 104-11.

Yu J, Zhang Y, Ye Y, DiSanto R, Sun W, Ranson D, et al. Microneedle-array patches loaded with hypoxia-sensitive vesicles provide fast glucose-responsive insulin delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015; 112(27): 8260-5.

Zhang X, Qi J, Lu Y, He W, Li X, Wu W. Biotinylated liposomes as potential carriers for the oral delivery of insulin. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier Inc.* 2014; 10(1): 167-76.

Zhang X, Wang Y, Zheng C, Li C. Phenylboronic acid-functionalized glycopolymeric nanoparticles for biomacromolecules delivery across nasal respiratory. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012; 82(1): 76-84.

Zhao BQ, Guo YR, Li XL, Zang T, Qu HY, Zhou JP, et al. Amelioration of dementia induced by A $\beta$  22-35 through rectal delivery of undecapeptide-hEGF to mouse brain. *Int. J. Pharm. Elsevier B.V.* 2011; 405(1-2): 1-8.

Zhao YZ, Li X, Lu CT, Lin M, Chen LJ, Xiang Q, et al. Gelatin nanostructured lipid carriers-mediated intranasal delivery of basic fibroblast growth factor enhances functional recovery in hemiparkinsonian rats. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier Inc.* 2014; 10(4): 755-64.

Zheng C, Guo Q, Wu Z, Sun L, Zhang Z, Li C, et al. Amphiphilic glycopolymer nanoparticles as vehicles for nasal delivery of peptides and proteins. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013; 49(4): 474-82.

Zununi Vahed S, Salehi R, Davaran S, Sharifi S. Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. *Mater. Sci. Eng. C.* 2016; 71: 1327-41.