ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de ingreso

como Académica de Número

DE LA FARMACIA GALÉNICA A LA NANOMEDICINA

Ilma. Sra. Da. María José Alonso Fernández

Discuso de contestación

Exmo. Sr. Dr. José Luis Vila Jato

Santiago de Compostela, 28 de abril 2010

A Javier Gang

ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de Ingreso como Académica de Número

«DE LA FARMACIA GALÉNICA A LA NANOMEDICINA»

Ilma. Sra. Da. María José Alonso Fernández

Discuso de contestación
Exmo. Sr. Dr. José Luis Vila Jato

Santiago de Compostela
Abril 2010

Contenido

PRÓLOGO 11

I INTRODUCCIÓN: BREVE PERSPECTIVA HISTÓRICA 15

II LA DÉCADA DE LOS 60: EL ORIGEN DE LOS LIPOSOMAS Y DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS 21

III LA DÉCADA DE LOS 70: ORIGEN DE LAS NANOPARTÍCULAS Y DE LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MACROMOLÉCULAS 23

III.1 Los liposomas: una solución para la liberación selectiva de fármacos 23

III.2 El origen de las nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos y vacunas 25

III.3 El inicio de la era biotecnológica y de la formulación de biomacromoléculas 27

III.3.1 La liberación controlada de biomacromoléculas a partir de matrices poliméricas 27

III.3.2 La mejora de la estabilidad y biodistribución de biomacromoléculas mediante la formación de complejos poliméricos 28

IV LA DÉCADA DE LOS 80: AVANCES EN BIOTECNOLOGÍA Y EN EL CONOCIMIENTO DE LAS BARRERAS BIOLÓGICAS 29

IV.1 Avances en el diseño y desarrollo de nanoestructuras (nanopartículas, nanocápsulas, liposomas, micelas) 29

IV.2 Las nanoestructuras como sistemas de transporte de fármacos a través de barreras biológicas (vía ocular, vía oral) 34

IV.2.1 Las nanoestructuras como sistemas de transporte de fármacos por vía ocular 35

IV.2.2 Las nanoestructuras como sistemas de transporte de fármacos por vía oral 36

IV.3 Avances en los sistemas de liberación de macromoléculas. La comercialización de sistemas biodegradables de liberación de péptidos 38

IV.4 Avances en la PEGilación de proteínas y formación de complejos poliméricos 38

V LA DÉCADA DE LOS 90: LA ERA DE LA TERAPIA GÉNICA Y DEL ORIGEN DEL TERMINO «NANOMEDICINA» 41

V.1 Avances en las nanopartículas, liposomas y otros nanosistemas 41

V.2 Avances en los sistemas de liberación de macromoléculas. Las micro y nanopartículas como sistemas de liberación de péptidos, proteínas y vacunas.....45

V.3 La terapia génica y la necesidad de nanoestructuras adaptadas a la liberación de material genético 47

V.4 El origen del concepto de nanomedicina.....50

VI EL INICIO DEL SIGLO XXI: LA ERA DE LA NANOMEDICINA 51

VI.1 El concepto de Nanomedicina. Impulso Europeo a la nanomedicina 51

VI.2 Avances científicos en nanomedicina.....54

VI.2.1 Nuevas terapias oncológicas no génicas.....54

VI.2.2 Nuevas vacunas 62

VI.2.3 Terapias génicas.....65

VII EL FUTURO DE LOS NANOSISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS.....71

DISCURSO DE CONTESTACIÓN 77

REFERENCIAS 87

Excmo. Sr. Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia,
Excmos. e Ilmos. Sras. Sres. Académicos
Sras., Sres

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a los miembros de la Academia de Farmacia de Galicia que han avalado y apoyado mi candidatura como Académica de número. Formar parte de esta Academia y poder contribuir al trabajo que en su seno se realiza representa para mí un gran honor.

Asimismo, me gustaría agradecer muy especialmente al profesor José Luis Vila Jato, mi maestro y mentor, quien pronunciará el discurso de contestación.

Agradezco muy sinceramente a todos los presentes que han tenido a bien acompañarme en un día tan significativo para mí.

Seguidamente, y antes de pasar a abordar el tema central de mi discurso «De la Farmacia Galénica a la Nanomedicina» me gustaría, a modo de prólogo, justificar la elección de este tema a la vez que agradecer a todos aquéllos que me han acompañado en mi trayectoria profesional.

PRÓLOGO

Han pasado 30 años desde que inicié mi tesina de licenciatura, a la que siguió mi tesis doctoral y, por lo tanto, desde mi incursión en el mundo de la investigación de la mano del Prof. José Luis Vila Jato. Han sido años de mucha entrega al trabajo, de grandes retos y satisfacciones. Décadas en cuyo transcurso he tenido la suerte de apreciar grandes logros científicos en mi ámbito de trabajo; y años de experiencia que me mueven a realizar un análisis, desde una perspectiva sin duda subjetiva, de las aportaciones del equipo de investigación del que he formado parte, así como aquéllas de los grandes científicos y mentores de quienes he tenido la satisfacción de rodearme.

Creo que no es posible valorar y entender en toda su dimensión el estado del conocimiento de un tema sin recurrir a los orígenes de las ideas y de las iniciativas y, por tanto, sin hacer el reconocimiento debido a aquéllos que nos han precedido y de quienes hemos aprendido. Hace 13 años, en la memoria que elaboré para concurrir a la plaza de catedrática que ocupo al día de hoy, presenté una reflexión pausada sobre los acontecimientos científicos que habían marcado mi trayectoria. Fue un ejercicio interno de análisis, de aprendizaje y de reconocimiento al trabajo de tantos científicos que iban dejando este-

la. Pero también fue un ejercicio de reflexión en clave interna sobre el gran privilegio de poder contribuir al desarrollo de la ciencia, de forma discreta, pero con sentido de la responsabilidad; responsabilidad ante el mundo científico, pero sobre todo ante nuestra sociedad.

Ahora se me presenta una ocasión formidable para hacer nuevamente una reflexión sobre los avances logrados en el mundo científico en el que me he visto inmersa; una reflexión que me permite comprender los logros científicos de las dos últimas décadas y valorar las posibilidades futuras de este ámbito de conocimiento. Por ello, a lo largo de mi discurso, me centraré en el análisis de aquéllos hitos históricos que, en mi opinión, han sido determinantes del avance de la ciencia y la tecnología relacionados con los sistemas de liberación de fármacos. Será, sin duda, una perspectiva personal y subjetiva, un análisis determinado por mi mente pero también por mi corazón, porque estoy convencida de que la fuerza de la creatividad científica procede tanto o más del corazón que del cerebro.

Es por todo ello, que este análisis no tiene sentido sin hacer referencia a todas las personas de quienes he aprendido, con quienes he compartido mis grandes satisfacciones, pero también mis dudas y preocupaciones en este maravilloso mundo de la ciencia. Debo centrar mi agradecimiento en aquéllas personas que han influido en mi saber científico, pero soy consciente que son muchos más de los que aquí menciono los que me han ayudado en mi desarrollo personal y profesional. Sin duda, los que más han influido en mi carrera científica son mis maestros Patrick Couvreur, Robert Langer y, de forma muy especial; mi maestro y mentor, José Luis Vila Jato, con quien me inicié en la carrera investigadora en el año 1981. Además del apoyo e influencia de mis maestros, en mi contribución a la ciencia he contado con un equipo de amigas más que compañeras, Loli, Begoña y Carmucha, quienes me han brindado

su ayuda y apoyo en los momentos más difíciles y a quienes les debo mi agradecimiento. Pero he de reconocer que toda mi trayectoria no hubiese sido posible si no hubiese contado con discípulos del máximo nivel y entrega; discípulos como Alejandro, Noemi, Marcos y Cecilia, con quienes tengo el gusto de seguir colaborando, pero también tantos otros que han buscado otros horizontes profesionales. El camino lo hemos hecho juntos. Ahora, muchos de ellos ocupan cargos importantes en la universidad, la empresa y el mundo sanitario, algunos de ellos grandes emprendedores. Y éste es mi mayor orgullo y satisfacción y, por ello, es a ellos a quienes quiero dedicar mi discurso de ingreso en la academia, el mayor honor y reconocimiento del que he sido objeto al día de hoy.

No sería justo decir que mi trayectoria no se debe sobre todo a mis padres; ellos me guiaron, supieron reconocer la importancia de una formación que ellos nunca pudieron adquirir. Esa es la gran herencia que me han dejado y por la que siempre estaré agradecida. Soy consciente también de que encontrar un compañero de vida como Ramón, una persona que valora tanto como yo el mundo científico y universitario, me ha alentado en esta senda de entrega a la ciencia y al conocimiento, algo que le agradezco. Finalmente, mi reciente pasión de madre me lleva a incluir en mi discurso una muy especial dedicatoria: a mi queridísimo hijo **Javier Gang**. Él es mi mayor fuente de felicidad energía e inspiración. Qué gran fortuna!

I
INTRODUCCIÓN: BREVE PERSPECTIVA HISTÓRICA

En la elaboración de este discurso he optado por la realización de un análisis reflexivo de los hitos históricos que, en mi opinión, han marcado la evolución de una serie de ámbitos del saber que conjugan principalmente la tecnología farmacéutica y la biofarmacia y farmacocinética. En este análisis me centraré en los avances realizados desde la década de los 60, por ser estas décadas las que han marcado de forma decisiva el estado actual del conocimiento sobre la nanotecnología farmacéutica y sobre el comportamiento biológico y aplicaciones terapéuticas de los nanosistemas de liberación de fármacos. Estos aspectos se engloban en el concepto actual de nanofarmacia, asociado a su vez a un concepto más amplio de nanomedicina. Asimismo, en este recorrido histórico introduciré la contribución que el grupo de investigación, NANOBIOFAR, promovido por el Profesor Vila Jato y por mi misma (Figura 1) ha realizado a lo largo de sus 24 años de existencia. El objetivo de esta introducción es el de presentar brevemente los antecedentes y hacer una mención explícita a ciertos hitos históricos que, en páginas sucesivas, serán abordados con el detalle preciso.

Partimos, por tanto, de la década de los 60, la cual marca el origen de los sistemas de liberación de fármacos y, desde la perspectiva farmacéutica, de la nanomedicina. Pero este origen,

Figura 1. Grupo de investigación, NANOBIOFAR

si bien casual como veremos más adelante, surge como consecuencia del importante conocimiento, acumulado a lo largo de la historia, sobre los medicamentos. Veamos algunos conceptos básicos y la situación del mundo de la galénica en este punto de arranque.

Es sabido que para que una molécula activa sea administrable a un organismo es necesaria su incorporación en una forma farmacéutica adecuada. A dicho proceso de incorporación y al producto resultante se denomina actualmente formulación. Pero este conocimiento no procede de épocas recientes sino que, ya en el siglo II **Claudio Galeno** sentó las bases de la formulación al ser el primero en reconocer la necesidad de someter a las sustancias medicinales a ciertos tratamientos previamente a su administración. En honor a Claudio Galeno este ámbito de actividad y conocimiento recibió la denominación de Galénica. Paradójicamente, a pesar de este origen remoto, la FARMACIA GALÉNICA no experimentó a lo largo de los siglos una evolución equiparable a la de otras ramas de la ciencia. De hecho, hasta bien alcanzado el siglo XIX, se aprecia una asombrosa falta de atención hacia las formas de dosificación. Fue

como consecuencia de la revolución industrial y, con ella, de la producción industrial de medicamentos, que la elaboración industrial de las formas farmacéuticas de uso más frecuente fue objeto de gran atención y desarrollo tecnológico. Este proceso de industrialización permitió la distribución de medicamentos a importantes poblaciones de pacientes.

A pesar de este proceso de industrialización, en la primera mitad del siglo XX la formulación de los medicamentos se regía por un simple modus operandi, un hágase según arte, no siendo reconocida la Farmacia Galénica como una verdadera ciencia sino más bien como un mero desarrollo tecnológico. Fue en la década de los años 50 cuando figuras como el estadounidense Higuchi y en España el profesor Cadórniga ponen de manifiesto la importancia de las propiedades físico-químicas de los fármacos en su formulación, sentando así un pilar muy importante en el desarrollo de la moderna tecnología farmacéutica.

Otro hito singular, cuyo origen se sitúa en la década de los 50 y su desarrollo posterior en los 60, es el conocimiento que dio origen a las disciplinas de BIOFARMACIA Y FARMACOCINÉTICA. Fruto de este conocimiento fue la que ha sido considerada como la mayor transformación histórica en el mundo de la Farmacia; transformación que dio lugar a una redefinición y valorización de la Farmacia Galénica. En efecto, hasta ese momento, la pauta de administración de los medicamentos se realizaba de forma empírica en base a la evaluación, normalmente subjetiva, de la respuesta terapéutica. Siendo consciente de la frecuencia con que se apreciaban fallos terapéuticos –motivados por una infra o sobredosificación- el Prof. Gerhard Levy de la *University of California in San Francisco (UCSF)* llevó a cabo estudios que pusieron de relieve la existencia de factores que afectan a la liberación de un principio activo a partir de una forma de dosificación y a su posterior llegada al torrente sanguíneo y consiguiente respuesta terapéutica. Basándose en este

conocimiento el Profesor Levy en el año 1953 decide organizar un curso para trasmitir sus conocimientos a sus alumnos, curso al que le dio el nombre de Biopharmaceutics, marcando así el origen de lo que en España se denomina Biofarmacia.

Curiosamente, en la misma época en la que en EEUU se sentaban las bases de la Biofarmacia, en Europa, el alemán F.H. Dost publicaba una obra que ha sido considerada como el primer libro de farmacocinética. En ella se establece la importancia de conocer la interacción cuantitativa del principio activo con el organismo al que se administra. El conjunto de los conocimientos generados junto con los aportados por Levy, permitieron el establecimiento de una serie de criterios biofarmacéuticos y farmacocinéticos que al día de hoy juegan un papel primordial en la formulación de fármacos y en el desarrollo de nuevas formas de administración. Puede decirse que dichos conocimientos, junto con los criterios físico-químicos, sentaron las bases científicas del desarrollo de nuevos sistemas de liberación y administración de fármacos.

Esta corriente científica generada en la década de los 50 propició sin duda los grandes acontecimientos científicos de la década de los 60, que siendo fruto de la casualidad, marcaron en gran medida la evolución de la Farmacia Galénica a la Nanomedicina. Estos hallazgos se deben al profesor Judah Folkman, profesor de *Havard Medical School*, quien publicó el primer artículo que revela la posibilidad de controlar la liberación de fármacos (Folkman, 1964) y al científico Bangham, descubridor de los liposomas (Bangham, 1965).

Sin embargo, la traslación de este conocimiento fue posible gracias al científico de origen hispano-italiano Alexandro Zafaroni, creador de la firma *Alza Corporation* en el año 1967. Zafaroni, fue consciente de las posibilidades de modernizar las formas de administración a las que reconoció un papel fundamental en la obtención de una respuesta terapéutica proponien-

do la denominación de «sistemas terapéuticos» y «sistemas de liberación de fármacos».

En la década de los 70 se asistió al origen de las nanopartículas como sistemas de liberación y se desarrolló el concepto de vehiculización u orientación selectiva de fármacos (drug targeting) anteriormente preconizado por Paul Ehrlich (Eherlich, 1906). Más concretamente fue el científico suizo, Peter Speiser, quien desarrolló por primera vez en la historia nanopartículas poliméricas con la intención de ser utilizadas para la liberación controlada de vacunas. (Birrenbach y Speiser, 1976). Científicos europeos tales como Gregory Gregoriadis, Francis Puisieux, Patrick Couvreur, Jörg Kreuter y Robert Gurni han contribuido decisivamente al desarrollo que en Europa han tenido los nanosistemas de liberación de fármacos y sus múltiples aplicaciones terapéuticas.

En la misma década se inicia la gran revolución biotecnológica, dando lugar al desarrollo de nuevas biomoléculas tales como péptidos y proteinas, moléculas que presentan notables limitaciones para su administración debido a su inestabilidad y dificultad para atravesar barreras biológicas. La consciencia de estas dificultades mueve al gran científico Robert Langer, profesor del *Massachuset Massachusetts Institute of Technology* (MIT), al desarrollo histórico de los sistemas de liberación de proteinas (Langer and Folkman, 1976).

Los descubrimientos producidos en los 70 en el ámbito de las nanopartículas como vehículos para la orientación selectiva de fármacos por parte de Patrick Couvreur y en la liberación controlada de macromoléculas, de la mano de Robert Langer determinaron el origen y evolución del grupo NANOBIOFAR que tuve el gusto de promover con la ayuda y colaboración del profesor Vila Jato. Ciertamente, habiendo tenido el privilegio de trabajar con estos ilustres científicos, no puedo dejar de considerar que mi modesta contribución a este ámbito ha venido

motivada por su influencia y su ejemplo. Ellos han sido y son grandes maestros y generadores de conocimiento.

Cierro este apartado introductorio con estas líneas al objeto de abordar el detalle de los magníficos descubrimientos producidos en estas últimas décadas, los cuales han permitido que, en el momento actual, la nanomedicina sea una realidad en la práctica clínica y tenga ante sí un brillante futuro. Asimismo, es mi objetivo reflejar la aportación que el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y de forma particular el grupo NANOBIOFAR ha realizado en esta línea a lo largo de las tres últimas décadas.

II
LA DÉCADA DE LOS 60: EL ORIGEN DE LOS LIPOSOMAS Y DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

En la década de los 60 se produjeron dos grandes acontecimientos científicos, curiosamente determinados por la casualidad, que marcaron en gran medida la evolución de la Farmacia Galénica. Estos hallazgos han tenido un desarrollo espectacular en tanto en cuanto suponen el origen del concepto de la liberación controlada y de la orientación selectiva de fármacos. El primero de estos hallazgos se atribuye al profesor Judah Folkman, profesor de Harvard Medical School, quien en el año 64 publicó un artículo en el que ponía de manifiesto la posibilidad de controlar la liberación de fármacos a partir de soportes poliméricos (Folkman, 64). Un año más tarde Bangham y colaboradores (Bangham, 65) hacen público el descubrimiento casual de los liposomas. Estos investigadores observaron que tras la incoporación de ciertos lípidos a una fase acuosa se formaban estructuras vesiculares, altamente organizadas, constituidas por lamelas o bicapas lipídicas a modo de membrana y un interior acuoso. Estas estructuras, de tamaño nanométrico, fueron seguidamente propuestas como sistemas especializados de liberación intracelular. Los liposomas han sido objeto de una importante atención por parte de investigadores de distintos ámbitos, lo que ha permitido, como se verá en páginas posteriores, un extraordinario desarrollo que ha llevado a su comercialización.

Paralelamente, se produjo un acontecimiento científico que fue clave para el desarrollo posterior de la nanotecnología farmacéutica. Este acontecimiento se debió al científico de origen hispano-italiano Alexandro Zaffaroni, creador de la firma *Alza Corporation* en el año 1967. Zafaroni, dotado de una importante visión de futuro y un alto nivel de determinación, tras recibir el rechazo de su entorno por su valoración excesiva –en opinión de algunos- de la forma de administración, decidió crear su propia compañía. Asimismo, y por el importante papel que consideró que tenían las formas farmacéuticas propuso la denominación de «sistemas terapéuticos» y «sistemas de liberación de fármacos». Como reconoció el profesor Higuchi (Higuchi, 1996), gracias a Zaffaroni, el mundo de la formulación de fármacos experimentó una profunda e irreversible transformación. Esta transformación llevó a que el campo de la liberación de fármacos recibiese un alto valor de reconocimiento en diversos ámbitos científicos y tecnológicos.

Como consecuencia de estos descubrimientos, surgidos del conocimiento de médicos, biólogos y tecnólogos farmacéuticos se desarrolló este ámbito transdisciplinar en el continente americano, el cual tuvo el correspondiente eco en la ciencia y la tecnología que en esos momentos se desarrollaba en Europa.

III
LA DÉCADA DE LOS 70: ORIGEN DE LAS NANOPARTÍCULAS Y DE LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MACROMOLÉCULAS

La década de los 70 fue absolutamente crítica para la nanomedicina debido al desarrollo y aplicación extensiva de los liposomas a la liberación de fármacos, pero también por representar el origen de las nanopartículas y de la liberación controlada de biomacromoléculas.

III.1 Los liposomas: una solución para la liberación selectiva de fármacos

El estudio de los liposomas dio lugar al desarrollo del concepto de vehiculización u orientación selectiva de fármacos (*drug targeting*) anteriormente preconizado por Paul Herlich a través de la idea de la bala mágica (Ehrlich, 1906). Básicamente la idea consistió en concebir estas nanoestructuras como pequeños contenedores de apareciencia celular, capaces de transportar los fármacos favoreciendo su estabilidad y liberarlos en el interior de la célula (Figura 2).

A lo largo de esta década fueron numerosos los trabajos publicados en este ámbito, siendo los científicos, Papahadjo-

poulos y Gregoriadis, reconocidos como los impulsores de las estructuras liposomales como sistemas de liberación de fármacos a nivel intracelular (Sozoka y Papahadjopoulus, 1980; Kirbi y Gregoradis, 1984; Perri, 2008; Fenske, 2008). Se desarrollaron numerosas composiciones liposomales en las que fueron encapsulados una amplia variedad de principios activos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos con diferentes indicaciones. Asimismo, fueron identificados ciertos problemas de estabilidad biológica de estas estructuras así como sus perfiles de biodistribución y bioasimilación. Los avances científicos permitieron el desarrollo clínico posterior de diversas formulaciones de interés en el tratamiento de pacientes oncológicos tales como la anfotericina y la doxorrubicina, que serán objeto de comentario posterior.

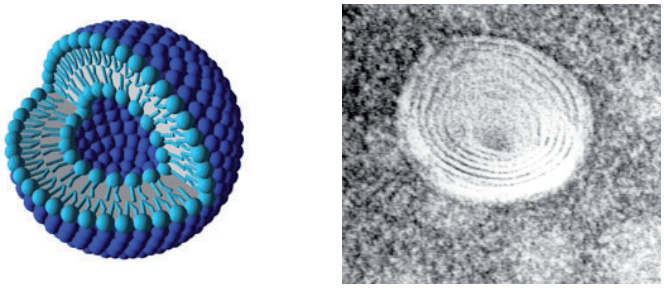


Figura 2. Ilustración de un liposoma unilamelar y microfotografía de un liposoma con una pared multilamelar y compartimentos acuosos.

Además, de las multiples combinaciones de fosfolípidos para lograr diferentes composiciones y configuraciones de los liposomas, a finales de esta década surge, promovido por Vladimir Torchilin, la idea de los liposomas orientados o vectorizados (targeted liposomas) con el fin de mejorar la biodsitribución de los liposomas, haciéndola más selectiva hacia el tejido diana. Se trata de liposomas modificados en su superficie a través de un enlace covalente con un anticuerpo monoclonal. Dicho anticuerpo es el encargado de dirigir el liposomas ha-

cia las células que sobreexpresan el antígeno correspondiente (Torchilin, 1979). Este tipo de liposomas, denominados posteriormente immunoliposomas, adquirieron un importante desarrollo en décadas sucesivas, estando en estos momentos decenas de formulaciones en fase de desarrollo clínico.

III.2 El origen de las nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos y vacunas

El origen de las nanopartículas poliméricas de interés biomédico se le atribuye al científico suizo, Peter Speiser (Kreuter, 2007). De hecho, el Prof Speiser, investigador del ETH (Swiss Federal Institute of Technology) es considerado como el padre de la nanotecnología farmacéutica. Esta idea fue desarrollada por su discípulo Gerd Birrembachn, quien obtuvo por primera vez nanopartículas de poliacrilamida con la intención de ser utilizadas como vehículos destinados a la liberación controlada de vacunas (Birrenbach, 1973; Birrembach y Speiser,1976).

A pesar de los exitosos resultados, en los años siguientes el Prof. Speiser decidió centrar sus esfuerzos en otros materiales más inocuos y con mayores posibilidades de traslación hacia un producto de utilidad clínica. En los años siguientes publica la obtención de nanopartículas de gelatina y albúmina haciendo uso de procedimientos suaves y fácilmente escalables (Marti y Oppenheim, 1977; Marti y col. 1878). Curiosamente, como se refleja en la figura 3, este trabajo no tuvo ninguna trascendencia, ni fue objeto de especial mención a lo largo de muchas décadas. De hecho, en la década de los 80 en la cual yo inicié mi formación en este campo, era frecuente la alusión a la no utilidad clínica de estas nanopartículas, por estar constituidas a base de proteínas desnaturalizadas. Sin embargo, a finales de los 90 se revaloriza esta gran contribución y se desarrolla la aplicación de las mismas para la

administración del placlitaxel (Harries y col, 2005) (Abraxane®), un éxito comercial de magnitudes probablemente insospechadas por el Prof. Speiser. El Abraxane es aprobado por la FDA como segunda línea de tratamiento de pacientes de carcinoma de mama.

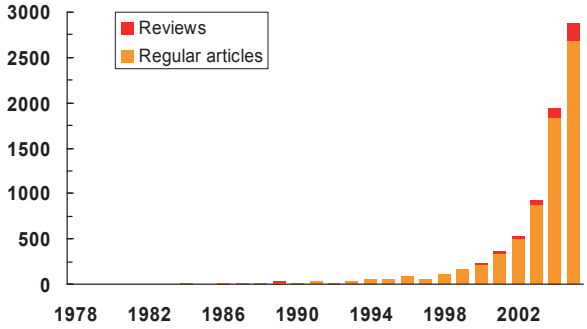


Figura 3. *Evolución en el número de referencias de un artículo pionero en el desarrollo de las nanopartículas: J.J. Marty, R.C. Oppenheim and P. Speiser,* **Nanoparticles: a New Colloidal Drug Delivery System**, *Pharm Acta Helv*, **53**, 17 (1978).

Otro ilustre pionero de las nanopartículas, el Prof. Patrick Couvreur, se incorporó al grupo del Prof. Speiser en el año 1976 por un breve período de tiempo pero suficiente para demostrar el carácter lisosomotrópico de las nanopartículas (Couvreur y col, 1977) y proceder al desarrollo de un nuevo tipo de nanopartículas biodegradables a base de polialquilcianoacrilatos (Couvreur y col, 1979). Poco a poco fue ampliándose el margen de conocimiento de estas nanopartículas desde la perspectiva de su biodegradabilidad y de su capacidad para asociar diferentes moléculas activas (Couvreur y col, 1979, 1980)

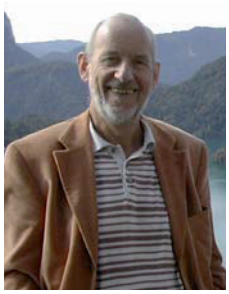


Figura 4. Fotografía del Prof. Patrick Couvreur (con permiso)

III.3 El inicio de la era biotecnológica y de la formulación de biomacromoléculas

III.3.1 La liberación controlada de biomacromoléculas a partir de matrices poliméricas

Los grandes avances en el mundo de la biotecnología, y su proyección en el desarrollo de nuevas biomoléculas, tales como péptidos y proteinas, conlleva en la década de los 70 a la necesidad de disponer de un sistema de liberación adecuado para estas moléculas complejas. Robert Langer, discípulo del Prof. Folkman, y actualmente profesor en el MIT, da respuesta a esta necesidad a través de su trabajo pionero en el que pone de manifiesto la posibilidad de controlar la liberación de proteínas a partir de soportes poliméricos (Langer y Folkman, 1976). Este trabajo marca un hito singular y el desarrollo espectacular que los sistemas de liberación de macromoléculas han tenido a lo largo de las tres últimas décadas. En esta misma década, el Prof. Langer sugiere el interés de aplicar la tecnología de liberación controlada al campo de las vacunas. La evidencia de este potencial la logra a través de la utilización de micropartículas esféricas, de acetato de etilvinilo, sugiriendo además la posibilidad de reducir el número de inyecciones e introduciendo así el concepto de vacunas monodosis (Langer y Preis, 1979).

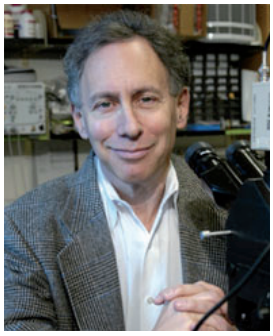


Figura 5. Fotografía del Profesor Robert Langer (con permiso)

III.3.2 La mejora de la estabilidad y biodistribución de biomacromoléculas mediante la formación de complejos poliméricos

Otro acontecimiento importante que nace de la necesidad de mejorar las formas de administración de proteínas es la formación de complejos covalentes de proteínas y polímeros y, mas concretamente, con polietilénglicol (Abuchowski, 1977; Davis, 2002; Veronese, 2002). Los complejos resultantes resultaron muy beneficiosos para mejorar la estabilidad biológica de las proteínas y, con ello, su tránsito por el torrente sanguíneo. Dicho proceso ha recibido la denominación de PEGilación de proteínas y, sin duda, podemos considerar que marcó la pauta de una línea de investigación notablemente exitosa desde la perspectiva de la comercialización de los productos resultantes. Asimismo, los interesantes resultados obtenidos en esta línea promovieron el desarrollo de nanoestructuras tipo liposoma y nanopartícula dotados de tiempos de circulación prolongados en el torrente sanguíneo. En las páginas siguientes abordaremos el importante desarrollo de estas iniciativas.

IV
LA DÉCADA DE LOS 80: AVANCES EN BIOTECNOLOGÍA Y EN EL CONOCIMIENTO DE LAS BARRERAS BIOLÓGICAS

La década de los 80 fue una década esplendorosa en cuanto al desarrollo de estructuras nanométricas. Además de los avances notables en el diseño de nanopartículas y liposomas, surgieron nuevas estructuras destinadas a la liberación de fármacos tales como las nanocápsulas y las micelas poliméricas. Esta fue también una década prodigiosa para la biotecnología y para la biología molecular y celular. Consecuencia de ello ha sido un importante arsenal de macromoléculas de naturaleza peptídica y proteínica, surgidas de las tecnología de recombinación del ADN, con interesantes propiedades terapéuticas y antigénicas. Asimismo, se progresó notablemente en el conocimiento sobre las barreras biológicas y, con ello, sobre las posibilidades que la nanotecnología y la química de polímeros ofrecen para abordar estas barreras.

IV.1 Avances en el diseño y desarrollo de nanoestructuras (nanopartículas, nanocápsulas, liposomas, micelas)

Las nanopartículas elaboradas a partir de policianoacilatos de alquilo experimentaron un importante desarrollo tanto desde

la perspectiva tecnológica y de su aplicación a la liberación de principios activos de distinta naturaleza como desde la base del conocimiento de su penetración intracelular, biodistribución y mecanismos de biodegradación (Glislain, 1983). En general, el enfoque terapéutico de estas nanopartículas ha ido dirigido al tratamiento del cáncer y de enfermedades concurrentes tales como infecciones derivadas de la inmunosupresión (Couvreur, 1982, Brigger, 2002).

Durante mi estancia postdoctoral en la Universidad de Paris Sur (Enero-Diciembre 1986), y bajo al dirección del Prof. Couvreur, tuve el honor de contribuir a esta línea de investigación a través de una colaboración con el Hospital oncológico Gustave Roussy de París. Mi trabajo consistió en profundizar en los mecanismos de biodegradación de las nanopartículas y en asociar fármacos antibióticos, tales como la ampicilina, de interés en el tratamiento de pacientes inmunodeprimidos sometidos a terapias oncológicas (Henry-Micheland, 1987; Youssef, 1988). En este trabajo colaboré, entre otros, con el Prof. Elías Fattal, actual director del departamento de Farmacia Galénica de dicha Universidad, quien en aquel momento realizaba su tesis doctoral.

Asimismo, durante mi estancia en dicho centro tuve la oportunidad de conocer a los investigadores responsables del diseño y desarrollo de una nueva estructura nanométrica de interés especial consistente en un núcleo lipofílico recubierto de una membrana polimérica (Alkhouri-Fallouh, 1986). El Prof. Francis Puisieux, el gran impulsor de la nanomedicina en Francia y director del Departamento de Farmacia Galénica en aquél momento, era quien lideraba el proyecto. Estas estructuras, denominadas nanocápsulas, han sido igualmente objeto de desarrollos posteriores en nuestro grupo de investigación. De hecho, nuestro grupo ha sido el responsable del desarrollo de las nanocápsulas de quitosano (que comentare-

mos en líneas posteriores) que en la actualidad se encuentran en fase de desarrollo clínico por parte de la empresa Isdín, a través de una alianza con la empresa Advancell, para el tratamiento de la psoriasis.

Otra ubicación clave en el desarrollo de los nanosistemas de liberación de fármacos en Europa se encontraba en esta época en Suiza, más concretamente en Ginebra. Allí trabajaba el Prof. Gurni, quien durante su estancia post-doctoral en Purdue Unviersity desarrolló por primera vez, y en colaboración con Nicholas Peppas y Gil Banker, las nanopartículas de poliácido láctico (Gurny, 1981). Estas nanopartículas, en aquél entonces denominadas «pseudolatices» han sido el origen de miles de publicaciones debido a su carácter biocompatible y biodegradable. Como se puede ver en la figura 6, tras la búsqueda de referencias en el ISI-web of knowledge con las palabras clave indicadas, nos encontramos con un claro incremento exponencial en el número de artículos publicados en las tres últimas décadas. Estas nanopartículas fueron propuestas inicialmente para la encapsulación de fármacos lipofílicos, encontrando un desarrollo posterior (década de los 90) para la liberación de macromoléculas.

Conviene precisar que si bien estas nanopartículas aún no están presentes en formulaciones comercializadas, lo cierto es que la inocuidad y potencial de las mismas vienen avaladas por la existencia de varias formulaciones de microsferas que han ido entrando en el mercado a lo largo de las últimas tres décadas. Estas formulaciones se caracterizan por aportar una liberación controlada de las moléculas encapsuladas durante períodos de tiempo que van desde 1 mes a 6 meses y sus indicaciones que incluyen el tratamiento de la esquizofrencia y otros transtornos psicóticos, dependencia al alcohol (Risperdal®, Invega®, Vivitriol®), cancer de próstata (Lupron depot®, Eligard®) y osteoartritis (Ortho Visc®).

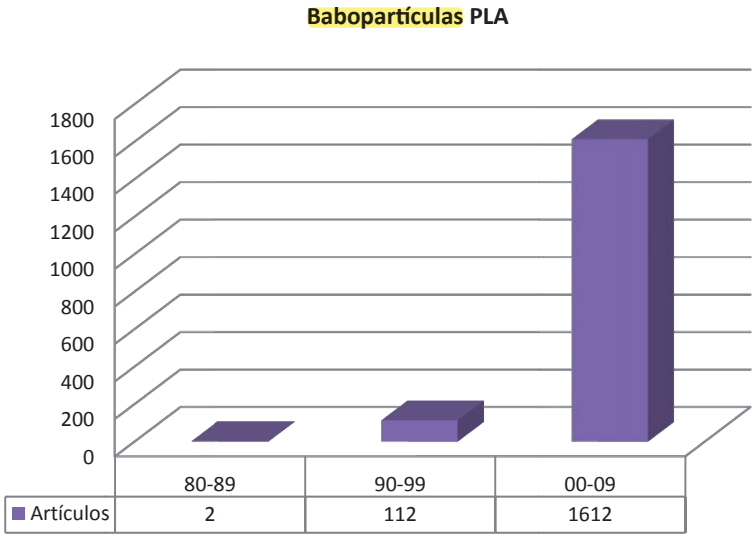


Figura 6. Evolución en el número de artículos recogidos en el ISI-Web of knowledge utilizando las palabras clave PLGA ó PLA ó polylactide y nanoparticles ó nanocarriers ó colloidal.

En cuanto al desarrollo de los liposomas, a lo largo de esta década se produce un incremento notable en el número de publicaciones científicas, incremento que, como se puede apreciar en la figura 7 se acentuará aún más en las décadas siguientes. Este incremento, viene acompañado del inicio de la comercialización de las formulaciones liposomales (Allen, 2004; Torchilin, 2005; Inmordino, 2006).

Asimismo, se progresa notablemente en los mecanismos de biodistribución e internalización celular de los mismos, evidenciando problemas de estabilidad biológica y una captura importante por parte del sistema fagocítico mononuclear. Estas consideraciones llevan a Alberto Gabizon y otros investigadores (Gabizon, 1988; Allen, 1989) a modificar la membrana liposomal mimetizando la membrana de los glóbulos rojos, para lo que utilizaron gangliósidos y ácido siálico. Los resultados positivos condujeron a un acontecimiento que ha

tenido una extraordinaria importancia en el desarrollo clínico de los liposomas. Se trata del diseño de los liposomas pegilados a los que se ha denominado «liposomas de largo tiempo de circulación» o «liposomas de segunda generación» (Klibanov, 1990). Estos liposomas, y el concepto asociado a los mismos, adquirieron especial relieve en la década de los 90 como se reflejará a continuación.

Paralelamente al conocimiento de los procesos de biodistribución, cabe destacar el progreso en el diseño y desarrollo de liposomas funcionalizados con aticuerpos monoclonales, propuestos por Torchilín a finales de los 70 (Torchilin, 1979; Martin, 1981)

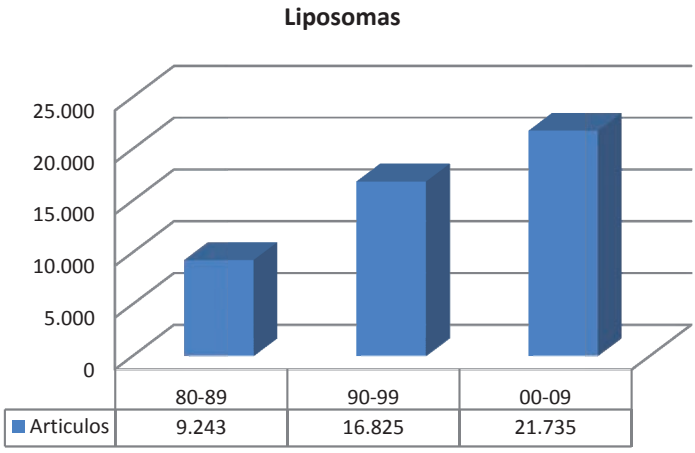


Figura 7. Evolución en el número de artículos publicados en las últimas décadas. Búsqueda realizada en ISI-Web of Knowledge con la palabra clave: liposome.

Por último, cabe destacar en esta década el inicio del desarrollo de las micelas poliméricas como sistemas de liberación de fármacos (Kavanov, 1989), si bien la tecnología de micelización mediante el uso de copolímeros bloque fue descrita con

anterioridad (Tuzar, 1976). Este tipo de vehículos alcanzan un gran desarrollo en la década de los 90, fundamente liderada por Kavanov y Kataoka (Kataoka, 1996, 2001)

IV.2 Las nanoestructuras como sistemas de transporte de fármacos a través de barreras biológicas (vía ocular, vía oral)

El notable desarrollo que adquirió la biología celular a lo largo de las décadas 60-80 tuvo una clara repercusión en el ámbito de la biofarmacia, en la medida en que permitió un conocimiento más preciso de las barreras biológicas y de las posibilidades de transporte de fármacos y nanoestructuras a su través. De este modo, la clásica teoría de la difusión pasiva a través de membranas y epitelios por la que se creía que se regían la mayor parte de los procesos de transporte, dio paso a una consideración de los mecanismos de transporte especializados y, con ello, de la posibilidad de que estructuras nanométricas puedan superar barreras biológicas. Asimismo, consecuencia de este desarrollo fue el surgimiento del concepto de mucoadhesion y la aparición de los primeros sistemas de liberación mucoadhesivos de la mano del Profesor Nagai (Nagai, 1985).

Bajo mi perspectiva, los hallazgos más interesantes en cuanto al interés de las nanoestructuras como sistemas de transporte de fármacos se centraron, en esta década, en la vía ocular y la vía oral. A continuación abordaré los avances específicos en esta líneas.

IV.2.1 Las nanoestructuras como sistemas de transporte de fármacos por vía ocular

Con respecto al interés de las nanoestructuras como sistemas de liberación de fármacos de uso oftálmico destaca el trabajo publicado en 1981, en el que se pone de manifiesto la utilidad de los liposomas conteniendo Iodorudixina para el tratamiento de la queratitis herpética (Smolin, 1981). A este trabajo pionero le siguen una serie de artículos en los que se demuestra la capacidad bioadhesiva de las nanopartículas de polialquilcianoacrilato y su capacidad para mejorar la retención y liberación controlada de los fármacos a nivel ocular (Wood, 1985; Harmia, 1986; Fizgerald, 1987).

La referencia de estas personas y la consciencia del vacío existente en este ámbito marcaron mi determinación para trabajar en el desarrollo de nanopartículas destinadas a la vía oftálmica a mi regreso a la Universidad de Santiago de Compostela en 1987. Mi decisión encontró todo el apoyo preciso en el profesor Vila Jato quien, de forma inmediata, me facilitó el contacto y la colaboración con empresas como Alcon y Laboratorios Cusi, así como con el equipo del profesor Pastor de la Universidad de Valladolid. El fruto de esta iniciativa ha visto la luz en décadas posteriores, habiendo convertido a nuestro grupo de investigación en un grupo de referencia internacional en el ámbito de las nanoestructuras de aplicación en oftalmología (Alonso, 2003; Paolicetti, 2009; De la Fuente, 2010). Más concretamente, los primeros trabajos realizados por mi primera doctoranda, Cándida Losa, pusieron de manifiesto la posibilidad de mejorar la penetración ocular de antibióticos y antiglaucomatosos, así como la de reducir la absorción sistémica de fármacos reductores de la presión intraocular (Losa, 91,92). Desde un punto de vista conceptual fue crítico el trabajo realizado en la tesis doctoral de Pilar Calvo, en colaboración con el Prof. Robinson, en el que revelamos la capacidad

de las nanopartículas de poliésteres para atravesar una barrera considerada hasta el momento como infranqueable, como es la córnea (Calvo, 94). Estos trabajos nos llevaron, a partir del año 2000, a comprobar que el tamaño de las nanoestructuras y su composición superficial, y en particular su capacidad adhesiva, eran factores determinantes de su internalización por parte de las células corneales y conjuntivales (De Campos, 2003, 2004; Enriquez de Salamanca, 2006).

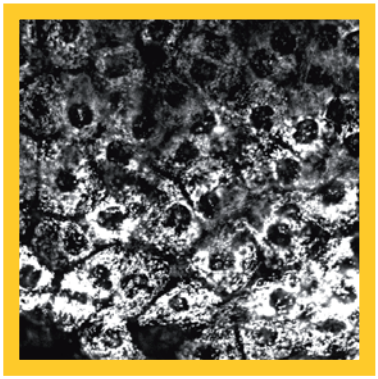


Figura 8. Fotografía tomada en el microscopio confocal de fluorescencia. La luminosidad se correlaciona con la internalización de las nanocápsulas en las células epiteliales corneales.

IV.2.2 Las nanoestructuras como sistemas de transporte de fármacos por vía oral

La posibilidad de franquear las barreras asociadas a la vía oral mediante el uso de nanoestructuras transportadoras de fármacos ha sido, y sigue siéndo, uno de los retos más importantes en el ámbito de la nanotecnología farmacéutica. Este reto ha venido motivado por el trabajo pionero publicado en los 80 por un grupo de investigadores, entre otros Maincent y Couvreur (Maincent, 1986), con quienes tuve el gusto de trabajar du-

rante mi estancia en Francia. Al igual que en la vía oftálmica, las primeras nanopartículas estudiadas para esta finalidad estaban compuestas por policianoacrilatos de alquilo, utilizadas por estos autores para la administración oral de la vincamina. Seguidamente, Damgé y Couvreur, dejaron constancia de la posibilidad de utilizar estas nanopartículas para la administración oral de insulina (Damgé, 1986). Este trabajo abrió grandes expectativas en relación con la posibilidad de administrar péptidos y proteínas por vía oral, lo que llevó en décadas siguientes a la valoración del potencial de diversos tipos de nanoestructuras para el transporte de macromoléculas a través de la mucosa intestinal. La información acumulada aboca a ciertas corrientes de escepticismo, sin embargo, el hecho demostrado de que las nanopartículas son capaces de atravesar la barrera intestinal induce a pensar en la posibilidad de optimizar esta capacidad a partir de un diseño racional y especializado de la composición de estas nanoestructuras (Prego, 2005; Csaba, 2006).

Asimismo, la identificación de la habilidad de las nanoestructuras para atravesar mucosas llevó a nuestro grupo de investigación y a otros a considerar su potencial para la administración nasal de macromoléculas (Janes, 2001; Köping-Hoggard, 2005; Csaba, 2009). Los éxitos logrados por nuestro grupo en esta línea en las dos últimas décadas serán objeto de mención en apartados sucesivos relativos a la liberación de péptidos, proteínas y vacunas.

IV.3 Avances en los sistemas de liberación de macromoléculas. La comercialización de sistemas biodegradables de liberación de péptidos.

El notable progreso producido en las décadas de los 70-80 en la liberación controlada de macromoléculas a partir de soportes poliméricos, y en particular a partir de los sistemas bioerosionables a base de copolímeros de ácido poliláctico/ glicólico (PLGA) (Langer, 1990), propició la comercialización de dos sistemas de liberación controlada de péptidos. Uno de ellos, desarrollado en Europa bajo la forma de un cilindro implantable permite la liberación controlada de goserelina durante un mes (Zoladex®) y, el otro, desarrollado en Japón, y al que nos hemos referido anteriormente, consistente en micropartículas destinadas a la liberación de acetato de leuprorelina (Lupron Depot®). Ambos sistemas, inicialmente desarrollados para conseguir una liberación controlada del péptido asociado durante un mes, han sido posteriormente optimizados para conseguir una liberación prolongada durante varios meses, siendo de amplia utilización en la práctica clínica actual del cáncer de próstata y otras indicaciones.

IV.4 Avances en la PEGilación de proteínas y formación de complejos poliméricos

Al igual que en el caso de los sistemas biodegradables de liberación controlada, los hallazgos realizados en las décadas 70-80 permitieron un desarrollo notable de los complejos proteína-polímero, alcanzando algunos de ellos su desarrollo clínico. Merecen, a mi juicio, especial mención los trabajos de PEGilación de proteínas tales como la asparaginasa (Ho, 1986) e interleuquina 2 (Katre, 1987), así como el estudio sistemático reali-

zado por R. Duncan y J. Kopecek sobre los complejos derivados de hidroxipropilmetacrilamida y fármacos antitumorales, cuyo desarrollo clínico se produjo en décadas posteriores (Duncan, 1983).

Los hallazgos observados en la modificación química de proteínas y en la formación de complejos poliméricos con moléculas determinantes de su biodistribución marcaron una era determinante en el desarrollo de los nanofármacos y, por consiguiente, de la nanomedicina. De hecho, al día de hoy son estos, junto con los liposomas, los nanofármacos más desarrollados y utilizados en clínica, así como también los que están generando más ingresos en el sector farmacéutico.

V
LA DÉCADA DE LOS 90: LA ERA DE LA TERAPIA GÉNICA Y DEL ORIGEN DEL TERMINO «NANOMEDICINA»

Sin duda, la etiqueta distintiva de los avances científicos de la nanomedicina en la década de los 90 es la de la terapia génica, siendo también en estos años cuando tiene su origen el concepto de nanomedicina. Sin embargo, no son menos importantes los avances producidos en iniciativas científico-tecnológicas desarrolladas en décadas anteriores y en particular en cuanto se refiere a los sistemas de liberación de proteínas y vacunas. Fue también en los años 90 cuando el grupo de investigación NANOBIOFAR empezó a proyectar su actividad orientada a la nanotecnología farmacéutica con un foco hacia el diseño de nanoestructuras capaces de transportar macromoléculas, proteínas y vacunas, a través de barreras mucosas.

V.1 Avances en las nanopartículas, liposomas y otros nanosistemas

Esta década vino marcada por la especialización en el diseño de nanoestructuras generándose una amplia variedad de nanopartículas, nanocápsulas, liposomas, complejos poliméricos, dendrímeros, micelas…, etc. además de estructuras mixtas re-

sultado de combinaciones de las anteriores. En la figura 9 –cortesía de la Profesora Ruth Duncan–, se recoge una ilustración de diferentes tipos de nanoestructuras. Existen excelentes revisiones que ponen de manifiesto el alcance y la singularidad de estas estructuras (Torchilin, 2005; Allen, 2004; Kataoka, 2001; Couvreur, Langer, 1998), sin embargo me parece conveniente centrarme en ciertas modificaciones estructurales aplicables a todos ellos, que han sido críticas para su desarrollo clínico posterior. Estas son la PEGilación y la funcionalización con determinantes para su orientación selectiva.

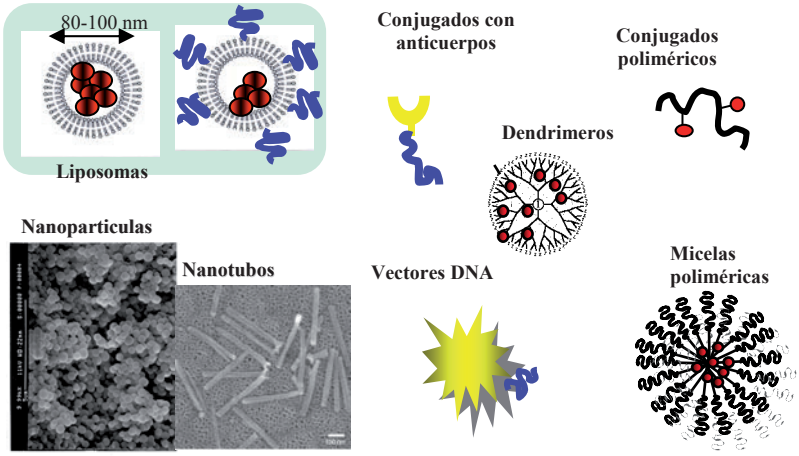


Figura 9. Fotografías y estructuras de diferentes tipos de nanosistemas de liberación de fármacos (cortesía de R. Duncan)

La idea de conjugar el PEG con proteínas, surgida en el década de los 80 a fin de mejorar su estabilidad y perfil de biodistribución, fue aplicada con éxito al mundo de los liposomas (Gabizon, 1988; Allen, 1989; Klivanov, 1990), dando lugar a la comercialización del Doxil® en 1997, la primera formulación del liposomas PEGuilados (Inmordino, 2006). Esta formulación, que contiene doxorubicina y fue aprobada inicialmente para el tratamiento del sarcoma de Kaposi asociado a los pa-

cientes de sida, ha dado posteriormente buenos resultados en el tratamiento del cancer de mama recurrente y el cancer de ovario (Gordon, 2001).

La información relativa a los liposomas motivó igualmente la búsqueda de iniciativas de PEGuilación de nanopartículas biodegradables. Los trabajos pioneros en esta línea fueron los publicados por Gref y Bazile (Gref, 1994; Bazile, 1995) relativos a las nanopartículas de PLA-PEG. Estos autores observaron que, tras la modificación superficial de las nanoestructuras con cadenas de PEG, se conseguía reducir su captura por parte del sistema fagocítico mononuclear, a través de lo que se ha denominado sistemas escudo (*stealth systems*) o de largo tiempo de circulación (*long circularing systems*). Gracias a su presencia prolongada en el torrente circulatorio, se observó que estos sistemas disponían de una mayor posibilidad de acceso a los órganos diana. Esta modificación resultó de interés para el transporte y orientación de fármacos citostáticos, cuyo tejido diana presenta habitualmente una hipervascularización y una mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos.

Al día de hoy existe abundante información en relación con el interés de una cubierta polimérica hidrofílica para las nanoestructuras que van destinadas a una administración intravenosa. Sin embargo, un descubrimiento pionero de nuestro grupo de investigación fue el que puso de manifiesto la importancia de la cubierta de PEG a fin de mejorar la estabilidad de las nanoestructuras en las superficies mucosas y, con ello, su facilidad para atravesar las barreras mucosas. En efecto, en el año 1998, el trabajo de la tesis doctoral de María Tobío (Tobío, 1998), permitió demostrar el efecto favorable de la PEGilación de las nanopartículas de poliácido láctico en su capacidad para transportar proteínas a través de la mucosa nasal. A este trabajo pionero siguieron otros a los que haré mención al abordar las nuevas vías de administración de fármacos.

Otra de las modificaciones sustanciales que ha afectado a todos los tipos de nanoestructuras es su funcionalización con moléculas orientadoras de las nanoestructuras. Esta funcionalización ha venido altamente determinada por el conocimiento de una variedad de moléculas dianas y biomarcadores conseguida en las últimas décadas, así como por el desarrollo en las décadas de los 70-80 de los immunoliposomas (Torchilin, 1979; Mastrobattista, 1999). El tipo más frecuente de moléculas utilizadas para la funcionalización han sido los anticuerpos monoclonales (ej. anti-HER 2; anti-CD19, REF), si bien existe una amplia variedad de moléculas pequeñas (ej. el ácido fólico y la transferrina) que se encuentran sobreexpresados en células tumorales; la manosa se sobreexpresa en células dendríticas,) y grandes moléculas (peptidos, proteínas, aptameros…) con las que se ha conseguido una orientación más específica de las nanoestructuras hacia las células diana. Esta estrategia de funcionalización, asociada al concepto de *targeted drug delivery*, ha sido aplicada a la practica totalidad de los nanosistemas transportadores de fármacos diseñados hasta el día de hoy (Langer, 2004; Omid, 2009; Faragi, 2009).

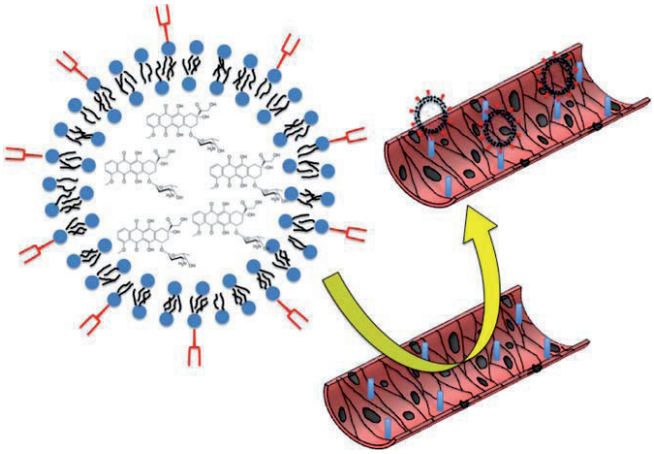


Figura 10. Esquema de un liposoma funcionalizado con anticuerpos monoclonales anti-E selectina, capaz de interaccionar selectivamente con el endotelio vascular (con permiso)

V.2 Avances en los sistemas de liberación de macromoléculas. Las micro y nanopartículas como sistemas de liberación de péptidos, proteínas y vacunas.

Siendo conscientes del éxito alcanzado en los 80 por los sistemas elaborados a partir de poliácido láctico/ácido glicólico (PLGA), en nuestro grupo de investigación nos planteamos el reto de desarrollar micro y nanopartículas de PLGA, especialmente adaptadas a la liberación de péptidos, proteínas y vacunas. Como punto de partida elegimos el péptido ciclosporina A (Sánchez, 1995), trabajo que fue objeto de la tesis doctoral de Alejandro Sánchez, si bien nuestro interés derivó posteriormente hacia moléculas más complejas tales como el interferón y las vacunas. Mi incursión en el mundo de las vacunas se produjo durante mi estancia post-doctoral en el MIT, donde bajo la dirección del profesor Langer trabajé en un gran proyecto coordinado por la OMS, cuyo objetivo era el desarrollo de una vacunas antitetánica mono-dosis (Alonso, 1992, 1993). En esta primera experiencia en la formulación de vacunas mi trabajo se centró en las micropartículas de PLGA. Sin embargo, los resultados inicialmente poco favorables me alentaron a seguir en el desarrollo de nanoestructuras capaces de estabilizar en su interior a la proteína encapsulada. De este empeño surgió el trabajo desarrollado por Dolores Blanco en su tesis doctoral; trabajo que resultó ser pionero en la nanoencapsulación de proteinas (Blanco, 1997). A este trabajo siguieron otros cuyo objetivo fue la encapsulación de la L-asparraginasa (Gaspar, 1998), el interferon (Sánchez, 2003) y el toxoide tetánico (Tobío, 1998). Como se indicó en un apartado anterior, la encapsulación del toxoide tetánico en nanopartículas de PLA-PEG permitió revelar la capacidad de estas nanopartículas para atravesar la mucosa nasal y la obtención de una respuesta immune sistémica y prolongada. Este trabajo objeto de la tesis de María Tobío, resultó crítico en el desarrollo del concepto de vacuna sin inyección.

Según aparece reflejado en líneas anteriores, esta década vino marcada por la aparición de una amplia variedad de nanoestructuras. Entre ellas, y reconociendo la visión personalista de este recorrido histórico, me complace destacar las nanoestructuras elaboradas a partir del polisacárido quitosano. Estas nanoestructuras han marcado, sin duda alguna, la visibilidad de nuestro grupo de investigación en el mundo de la nanotecnología farmacéutica. Esta iniciativa surgió de nuestro interés en desarrollar nanosistemas, alternativos a los del PLGA, capaces de interaccionar con barreras mucosas y de alojar en su estructura macromoléculas peptídicas y proteínicas. Para ello, seleccionamos el quitosano, biomaterial reconocido por su capacidad muchoadhesiva y promotora de la absorción de fármacos. La Dra. Calvo, en colaboración con la profesora Remuñan y el profesor Vila Jato, fue la responsable de desarrollar estas nanoestructuras, tipo nanopartícula y tipo nanocápsula, y de valorar la posible asociación de proteínas y otros fármacos a las mismas (Calvo, 1997, 1997). A estas composiciones siguieron varias más en el contexto de varias tesis doctorales, en colaboración con los profesores Torres, Seijo, Remuñan, Sánchez y Vila jato. Todas ellas fueron patentadas y licenciadas posteriormente a la empresa Advancell S.A., promoviendo la creación de la unidad Nanosystems. Advancell, a través de un acuerdo con la empresa Isdin S.A., participa en el desarrollo de una formulación de nanocápsulas de quitosano cargadas de ciclosporina que se encuentra en fase clínica II en su indicación para el tratamiento de la psoriasis.

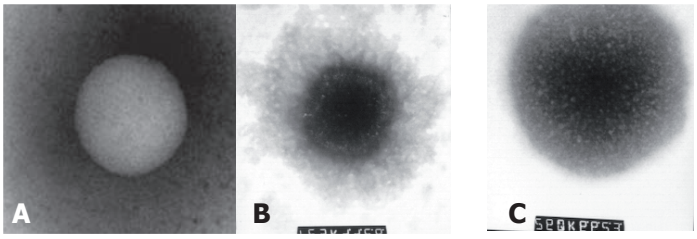


Figura 11. Fotografías tomadas en el microscopio electrónico que muestran la apariencia de las nanocápsulas (A) y nanopartículas de quitosano (B) y de quitosano-PEG (C).

Nuestro grupo de investigación ha investigado el potencial de los nanosistemas de quitosano para facilitar la administración de péptidos y vacunas por vias alternativas a la vía parental. Así, los resultados iniciales en esta línea nos permitieron revelar la capacidad de estos nanosistemas para mejorar la absorción nasal de péptidos como la insulina (Fernandez-Urrusuno, 1999). Años más tarde, Cecilia Prego y Marcos García, María Alonso y Desirée Teijeiro, demostrarían en sus respectivas tesis doctorales – codirigidas con las profesoras Torres y Remuñán, el potencial de nuevas nanoestructuras basadas en quitosano para mejorar la absorción nasal e intestinal de la calcitonina (García, 2005; Prego, 2006; 2006; Teijeiro-Osorio, 2009).

Asimismo, en los comienzos de la década de los 2000, a través del trabajo realizado en la tesis de Ana Vila, pudimos demostrar el potencial de las nanopartículas de quitosano como sistemas de transporte de antígenos – y en partícular del toxoide tetánico- a través de la mucosa nasal (Vila, 2004). Estos resultados nos permitieron plantear a la Organización Mundial de la Salud y a la Fundación «Bill y Melinda Gates» el posible uso de estas nanoestructuras para el desarrollo de vacunas que no requieran inyección. La receptividad de las organizaciones mencionadas nos han llevado a focalizar en gran medida nuestros esfuerzos en esta línea de investigación

V.3 La terapia génica y la necesidad de nanoestructuras adaptadas a la liberación de material genético

La revolución que la terapia génica causó en el mundo de la liberación de fármacos fue contundente a partir de las expresiones pronunciadas por los científicos más prestigiosos en el ámbito. Así, el nobel de química, Jean Paul Behr pronunció la frase

en 1994 «Paradójicamente el punto débil de la terapia génica es el vehículo y no el fármaco». Igualmente, I. Verma, uno de los científicos más afamados en terapia génica declaró a la revista Times en 1999 «la terapia génica solo tiene tres problemas: liberación, liberación, liberación». Estas afirmaciones responden a la necesidad de superar importantes barreras biológicas, como las que se representan en la figura.

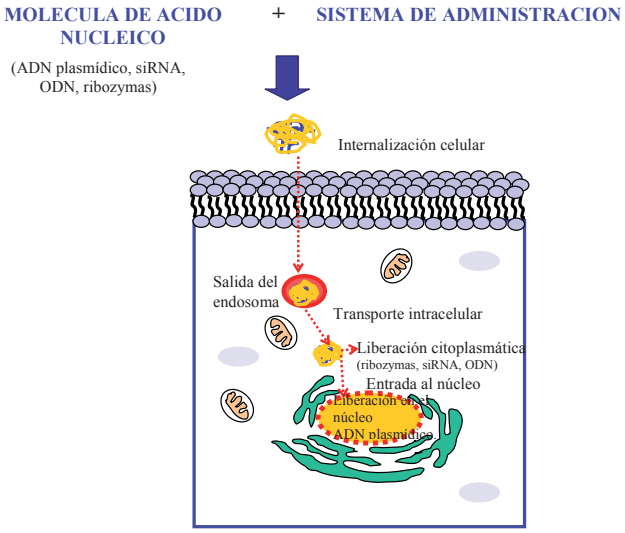


Figura 12. Barreras intracelulares que han de ser superadas por las moléculas de material genético tras su administración (tomada de la tesis de Manuela Raviña)

Siendo conscientes de la necesidad de liberar adecuadamente el material genético, un nutrido número de investigadores expertos en la liberación controlada de macromoléculas centraron su actividad en la adecuación de las nanoestructuras para la liberación de dicho material. Nuestro grupo de investigación participó igualmente en esta iniciativa, si bien los resultados de esta actividad han sido objeto de publicación en la

última década. En ésta, que podríamos denominar, primera fase del desarrollo de vehículos para terapia génica, surgieron junto con los vectores virales, los vectores sintéticos.

Los vectores virales han sido objeto de una gran atención por su elevada capacidad transfectiva. Los que han resultado más exitosos han sido los retrovirus, los adenovirus y los virus adeno-asociados. Sin embargo, a pesar de su desarrollo clínico, –que veremos en la siguiente década- lo cierto es que la posibilidad de desarrollar reacciones adversas, su incapacidad para transportar elevadas cantidades de material genético y su elevado coste de producción han restringido notablemente su espectro de aplicación.

El desarrollo de vectores sintéticos se ha centrado en la formación de complejos a partir de liposomas –denominados lipoplexes- y polímeros catiónicos – denominados poliplexes- entre los que destacaron en esta época la polietilenimina (PEI), poli-L-lisina (PLL). Tanto los tratamientos como los vehículos han sido objeto de un amplio desarrollo posterior, como veremos a continuación.

Retrovirus Adenovirus Virus adeno-asociados Lipoplexes

Figura 13. Estructura simulada de diferentes tipos de vectores virales y de los lipoplexes

V.4 El origen del concepto de nanomedicina

A pesar del desarrollo, patente en las líneas precedentes, que los nanosistemas de liberación de fármacos han experimentado a lo largo de las últimas 4 décadas, el origen del término nanomedicina data de finales de la década de los 90. La introducción del término se le reconoce a Robert Freitas, quien utilizó en primer lugar el término «nanotecnología médica» en el 1998 y al año siguiente editó un libro con el nombre de nanomedicina «nanomedical book series». Sin duda se trata del origen del término y no de la actividad ligada al término. De hecho, la década de los 2000 se ha caracterizado no sólo por el gran desarrollo sino también por el amplio debate en torno al concepto de nanomedicina y las disciplinas asociadas a dicho término. Llama la atención la confusión generada en la literatura científica en relación con este tema debido a la diferente terminología. Así, en un artículo reciente se señala que la evolución de las publicaciones científicas en el ámbito de la nanomedicina ha pasado de 10 artículos a finales de los 80 a 1.200 en el 2004. No cabe duda de que, al menos en los comienzos del recuento, se ha infraestimado la actividad debido a la terminología confusa existente al respecto.

VI
EL INICIO DEL SIGLO XXI: LA ERA DE LA NANOMEDICINA

VI.1 El concepto de Nanomedicina. Impulso Europeo a la nanomedicina

Sin duda, una vez acuñado el término «nanomedicina» y conocida la receptividad del mismo en la comunidad científica internacional así como por parte de las agencias financiadoras de la investigación, parece lógico pensar que la década del 2000 sea la década en la que surge la nanomedicina. Y todo ello porque, a pesar de la trayectoria histórica de este ámbito, y en particular en cuanto se refiere a los nanosistemas de liberación de fármacos, el interés despertado en una amplia variedad de colectivos científicos es ciertamente llamativo.

En el año 2004 se desarrollan una serie de iniciativas en EEUU y en Europa que han trazado el camino de la nanomedicina en los últimos años. Destaca el mapa de ruta en nanomedicina fijado por el Instituto Nacional de la Salud (NIH) americano, así como el desarrollo de centros de nanotecnología asociados al en el Instituto Nacional del Cáncer perteneciente a la misma institución. En Europa destacan las iniciativas promovidas por la Fundación Europea de la Ciencia (ESF) y por la comisión Europea, cuyo contenido detallo a continuación.

La ESF organizó a lo largo del 2004 una serie de reuniones científicas que supusieron un foro de debate en cuanto a la posición europea de la nanomedicina y las tendencias deseables para la nanomedicina en Europa. Habiendo tenido el privilegio de trabajar en este foro y de participar en la redacción del documento «*ESF Scientific Forward Look on Nanomedicine*», soy consciente de las dificultades asociadas a la identificación de los ámbitos estratégicos en nanomedicina, así como de la correspondiente definición de este nuevo término. Según este documento la nanomedicina tiene como objetivo el seguimiento, tratamiento y mejora de los sistemas biológicos humanos haciendo uso de nanoestructuras. En este contexto, el concepto de tamaño nanométrico se refiere al intervalo que va desde 1 nm a varios cientos de nm. Asimismo, se establecen dos áreas críticas en nanomedicina: (i) la referida a las técnicas analíticas y de análisis de imagen y (ii) la relacionada con nuevas terapias y sistemas de liberación de fármacos. Dentro de las nuevas terapias se incluye igualmente la ingeniería de tejidos. Además de indicar recomendaciones de las líneas preferentes en estos dos ámbitos, se insiste en la importancia de abordar los aspectos clínicos y toxicológicos relacionados con estas terapias.

Por su parte, la comisión europea (EC) decidió, en esa misma época, la constitución de la **plataforma tecnológica europea de nanomedicina**. El objetivo de la plataforma es el de dar un impulso a este ámbito científico desde la óptica traslacional, es decir de desarrollo de nuevos conocimientos, productos y tecnologías susceptibles de aplicación clínica. Se establece que **la nanomedicina tiene como objetivos el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades, basados en la interacción entre el organismo humano y materiales o estructuras cuyas propiedades están determinadas por su escala nanométrica**. Asimismo, desde la perspectiva de la EC se consideró que la plataforma de nanomedicina debía englobar tres grandes áreas: el nanodiagnóstico, la medicina regenerativa y los sistemas de liberación de fármacos. Estas áreas mayoritariamente coincidentes con las identificadas desde la ESF.

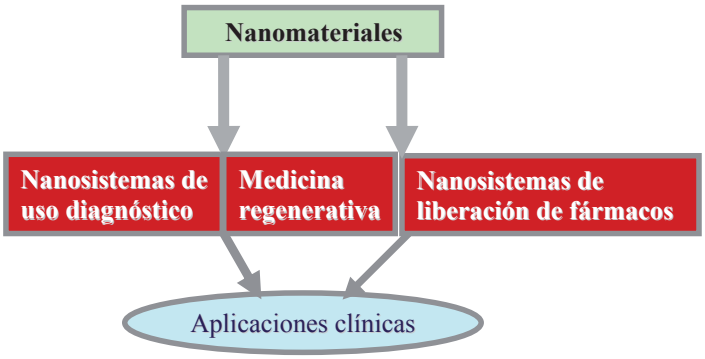


Figura 14. Esquema que muestra los ámbitos de actividad de la nanomedicina según el documento «Forward Look on Nanomedicine» de la ESF.

Desde la perspectiva de la comisión europea la constitución de la plataforma de nanomedicina se plantea como una oportunidad para Europa si tenemos presente el número creciente de compañías biotecnológicas (cerca de 2000 en 2004) y el mercado creciente de dicho ámbito. Asimismo, se plantea la necesidad de integrar y estructurar el sector de la nanomedicina. De este modo, y siendo conscientes de la necesidad de encauzar la investigación en este gran área, en 2006, se elabora la primera agenda estratégica europea en nanomedicina. Tres años más tarde, en 2009, se publica la hora de ruta de la nanomedicina hasta el 2020 (coincidiendo con la Estrategia Europea 2020). En este documento se establece claramente que en el área de nanofarmacia y nanomedicamentos (nanopharmaceutics, nanopharmaceuticals) se esperan grandes hitos e innovaciones de gran valor para la industria farmacéutica. Además, se indica que el desarrollo de la tecnología farmacéutica estará altamente ligado a los avances en nanotecnología. Aspectos de esta hoja de ruta serán objeto de comentario en el apartado en el que se aborda el futuro de la nanomedicina.

En España, se creó la plataforma española de nanomedicina, a imagen de la europea, con el objetivo de promover la investigación en nanomedicina en España. Asimismo, se ha

conseguido que la nanomedicina esté presente en las iniciativas de grandes programas consorciados tales como Consolider, Cenit y Ciber. El número de centros adscritos a dicha plataforma ha ido aumentando en los últimos años, de modo que al día de hoy forman parte de la misma 50 entidades/grupos con interés específico en sistemas de liberación de fármacos: 31 centros o grupos de investigación públicos, 2 centros tecnológicos, 13 empresas y 4 grupos pertenecientes a hospitales. La naturaleza y orientación de estas entidades pone de manifiesto el alcance transdisciplinar y traslacional de esta área científica.

VI.2 Avances científicos en nanomedicina

Centrándonos en el campo específico de la nanomedicina relacionado con los sistemas de liberación de fármacos, e independientemente de las distintas aproximaciones científico-tecnológicas, bajo mi perspectiva hay tres ejes fundamentales en los que se ha centrado la atención: un eje es el relacionado con nuevas terapias oncológicas no génicas; otro eje es el de las vacunas, cuyo desarrollo más reciente se encuentra fuertemente ligado al diseño de nuevos adyuvantes de tamaño nanométrico y, por último, está el eje de la terapia génica cuya finalidad terapéutica coincide en gran medida con los ejes anteriores (cancer y prevención de enfermedades), pero que por sus características intrínsecas e importante desarrollo conviene abordar de forma separada. En todas estas situaciones, la presencia de un vehículo transportador capaz de facilitar y potenciar la acción de los fármacos o antígenos se ha revelado como determinante para conseguir el éxito terapéutico.

VI.2.1 Nuevas terapias oncológicas no génicas

El éxito de la nanomedicina hasta el momento presente se refleja sobre todo en el número de formulaciones comercializadas, que en su mayor parte han sido indicadas en el tratamiento

del cáncer. A continuación, se presenta una revisión de las formulaciones comercializadas y algunas de las que están siendo investigadas en distintas fases clínicas. Esta revisión ha sido realizada por Pilar Calvo y Vila Jato (Calvo y Vila-Jato, 2009) y actualizada al momento presente.

Los productos comercializados basados en nanosistemas de liberación de fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer, clasificados en función del tipo de formulación son:

Formulaciones de liposomas:

- MYOCET®: formulación de liposomas que contienen clorhidrato de doxorubicina. Indicación: tratamiento del cáncer de mama metastásico.
- DAUNOXOME®: formulación de liposomas (tamaño 35-60 nm) que contienen citrato de daunorubicina. Indicación: tratamiento del sarcoma de Kaposi avanzado relacionado con HIV.
- DOXIL® (CAELIX®): formulación de liposomas modificados con PEG (tamaño 80-90 nm) que contienen doxorubicina. Indicaciones: cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi relacionado con HIV y mieloma múltiple.
- ONCO-TCS (MARQIBO®): formulación de liposomas (115 nm) que contienen sulfato de vincristina. Indicación: linfoma no Hodgkin.
- DEPOCYT®: formulación de nanoestructuras lipídicas multivesiculares que contienen citarabina. Indicación: meningitis linfomatosa

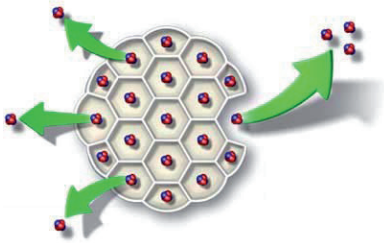


Figura 15. Representación del sistema DepoFoam®. Tras su administración tiene lugar una reordenación de las bicapas lipídicas y el fármaco es liberado por un proceso de formación de poros y erosión.

Nanopartículas:

- ABRAXANE®: formulación de nanopartículas (130 nm) de albumina que contienen paclitaxel. Indicación: cáncer de mama metastásico tras el fallo de una quimioterapia combinada o recidiva después de seis meses con quimioterapia adyuvante. Estas nanopartículas, desarrolladas según la tecnologia de American Biosciences se presentan como producto liofilizado que se conserva a temperatura ambiente y una vez reconstituido es estable durante 8 h en nevera. La mayor eficacia de Abraxane sobre la clásica formulación de paclitaxel (Taxol®) se debe a la interacción de la albúmina con dos proteinas gp60: La primera de ellas se localiza en la superficie de las células del endotelio vascular y a consecuencia de ésta interacción tienen lugar una serie de procesos bioquímicos que determinan que las nanopartículas se acumulen en el fluido intersticial que rodea el tumor. La segunda proteína, denominada SPARC (secreted protein acidic rich in cysteine) o BM40 u osteonectina, se encuentra en la superficie de muchas células tumorales e interacciona con la albúmina lo que da lugar a una mayor concentración de paclitaxel en éstas células.

Complejos proteína-polímero:

- ZINOSTATINA®: Formulación de conjugado de SMANCS. Indicación: carcinoma hapatocelular
- ONCASPAR®: formulación de PEG-L-asparaginasa. Indicación: leucemia linfoblástica aguda.
- NEULASTA: formulación de PEG-GCS: Indicación: tratamiento de la neutropenia asociada a quimioterapia.

Asimismo, la constatación del éxito de estas formulaciones se refleja en el amplio número de **formulaciones que se encuentran en fase de desarrollo clínico**, algunos de los cuáles son:

Formulaciones de Liposomas:

- Annamicina liposomal: formulación de liposomas que contienen annamicina (derivado de la doxorubicina). Ensayo clínico en fase I/II en pacientes con tumores sólidos refractarios a quimioterapia convencional.
- S-CKD 602: formulación de liposomas peguilados que contiene el análogo de la camptotecina CKD 602 (belotecan). Ensayo clínico en fase I en pacientes con con tumores sólidos refractarios a quimioterapia convencional.
- OSI-211(Nx211): formulación de liposomas peguilados que contiene el análogo de la camptotecina (lurotecan). Ensayo clínico en fase I en pacientes con tumores sólidos refractarios a quimioterapia convencional.
- SPI-077: formulación de liposomas peguilados que contiene cisplatino. Ensayo clínico en fase II en pacientes con cáncer cuello y cabeza no operable.
- SLIT CISPLATIN: formulación de liposomas que contienen cisplatino para su administración por vía pulmonar utilizando la tecnologia SLIT (sustained release lipid inhalation targeting). Ensayo clínico en fase I/II

para el tratamietno de osteosarcoma metastásico.

- LIPOPLATIN: formulación de liposomas que contienen de cisplatino. Ensayo clínico en fase III: cancer pancreático no operable.
- OSI-7904L(GS7904L): formulación de liposomas que contienen el inhibidor de la timidilato sintasa. Ensayo clínico fase II: tumores sólidos refracarios a la quimioterapia convencional.
- ATRA IV: formulación de liposomas que contienen tretinoina que posee la designación de medicamento huerfano por la FDA para el linfoma no Hodgkin de células T y leucemia aguda y crónica. Además se encuentra en ensayo clínico, fase II, para el tratamiento de cáncer hepático metastásico.
- AROPLATIN: formulación de liposomas que contienen un derivado liposoluble de platino. Ensayo clínico fase II para el tratamiento de cáncer colorectal y renal.
- LEP-ETU: formulación de proliposomas que contienen paclitaxel. Ensayo clínico fase I, en pacientes con cáncer avanzado.
- LEM-ETU: Es una formulación análoga a la anterior pero conteniendo mitoxantrona. Ensayo clínico fase I, en pacientes con cáncer avanzado.
- MTB-0206 (EndoTAG-1): formulación de liposomas catiónicos que contienen paclitaxel. Ensayo clínico fase II para el tratamento de adenocarcinoma pancreático no operable.
- SARCODOXOME: formulación de liposomas que contienen doxorubiccina patentada por la firma española GP Pharma.. Ha obtenido la categoria de medicamento huerfano tanto por la EMEA como por la FDA para el sarcoma de tejidos blandos.

Formulaciones de nanopartículas:

- AI-850: formulación de paclitaxel que emplea la tecnologia patentada por la firma Acusphere mediante la cual se obtienen nano o micropartículas porosas que permiten solubillizar fármacos hidrófobos. Ensayo clínico fase I (Mita, 2007)

Formulaciones de micelas poliméricas:

- GENEXOL-PM: formulación de placlitaxel incluido en micelas poliméricas de 20 a 50 nm a base de un copolímero de PEG y poli DL láctico. Ensayo clínico en Fase II (Kim, 2007).
- SP1049C (SUPRATEK): formulación de doxorubicina en micelas constituidas por un copolímero tribloque de Pluronic L61 y Pluronic F127. Ensayo clínico en fase I (Danson, 2004).
- NK 911: formulación de doxorubicina en micelas de 40 nm que se obtienen a partir de un conjugado de doxorubicina y un copolímero constituido por un Pluronic de 5000 D y un poliaspártico. Ensayo clínico en fase I en cáncer de páncreas (Matsumura, 2004).
- NK 012: formulación de micelas de un copolímero de PEG y ácido poliaspártico, que contiene un derivado de la camptotecina (SN-38). Ensayo clínico en Fase I en carcinomas renales, meduloblastomas y carcinomas hepatocelulares.
- NC-6004: formulación de micelas de un polímero bloque de PEG y poliaminoácido, que contiene cis platino. Ensayo clínico en Fase I.
- AP-5346: formulación de micelas de un copolímero de PEG y poliaminoácido que contiene paclitaxel. Ensayo clínico en fase I en pacientes con cáncer de cuello metastático.

Formulaciones de complejos poliméricos:

- YOTAX/CT2103: complejo de poliglutamato-placlitaxel. Ensayo clínico en Fase III para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- CT2106: complejo de poliglutamato-camptotecina. Ensayo clínico en Fase I para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- PK1: complejo de HPMA-doxorrubicina. Ensayo clínico en Fase II para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- PK2: complejo de HPMA-doxorrubicina-galactosamina. Ensayo clínico en Fase I/II para el tratamiento de carcinoma hepatocelular.
- PNU166945: complejo de HPMA-placlitaxel. Ensayo clínico en Fase I para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- MAG-CPT: complejo de HPMA-camptotecina. Ensayo clínico en Fase I para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- AP5280: complejo de HPMA-carboplatino platinato. Ensayo clínico en Fase I para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- AP5346: complejo de HPMA-DACH-platinato. Ensayo clínico en Fase I/II para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- DOX-OXD: complejo de dextrano-doxorrubicina. Ensayo clínico en Fase I para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- DE310: complejo de dextrano-camptotecina. Ensayo clínico en Fase I para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- PROTECAN: complejo de PEG-camptotecina. Ensayo clínico en Fase II para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.
- **Conjugados de polímero-proteína**:

- PEG-AXYS: conjugado PEG-IFN alfa 2b. Ensayo clínico en Fase I/II para el tratamiento de melanoma, carcinoma renal y mieloma múltiple
- PEG-INTRO: conjugado PEG-IFN alfa 2a. Ensayo clínico en Fase I/II para el tratamiento de melanoma, carcinoma renal y mieloma múltiple
- ADI-PEG 20: conjugado PEG arginina deaminasa. Ensayo clínico en Fase I para el tratamiento carcinoma hepatocelular.
- PEG-PGA: Conjugado PEG-glutaminasa. Ensayo clínico en Fase I/II para el tratamiento de diversos cánceres.

Como vemos la mayoría de las terapias comercializadas se presentan bajo la forma de liposomas, si bien existe un número creciente de formulaciones tipo nanopartículas o micelas poliméricas.

En relación con las últimas investigaciones llevadas a cabo en este ámbito cabe señalar, el uso de nuevos polímeros y la funcionalización de las nanoestructuras con el objetivo último de lograr una mayor especificidad sobre las células diana. Los materiales poliméricos más utilizados en esta década para la formación de nanoestructuras son los derivados acrílicos, los poliaminoácidos y los dendrímeros (Gonzalo, 2009). Asimismo, destacan en esta línea los trabajos realizados en el grupo del Prof. Couvreur relacionados con los vehículos escualenizados (constituidos a base de conjugados con escualeno), que representan una estrategia altamente innovadora para diversas aplicaciones, entre otras la liberación de citostáticos (Harivardhan y Couvreur, 2009).

La actividad que en esta línea ha desarrollado nuestro grupo se inició a finales de los 90 con la nanoencapsulación de la L- asparraginasa (Gaspar, 1998) y el interferon alfa en nanopartículas de PLGA (Sánchez, 2003). Más recientemente, nuestra

atención se ha centrado en generar nuevas nanoestructuras, nanocápsulas, a partir de quitosano y de poliaminoácidos tales como la poliarginina (Hervella, 2008). Según demostró Victoria Loza en su tesis doctoral, estas nanocápsulas nos han permitido incrementar de forma significativa la actividad antitumoral de fármacos como el docetaxel (Lozano, 2008). Este trabajo, desarrollado en colaboración con la Dra. Torres y con los grupos liderados por el Dr. Dominguez y el Dr. Riguera, nos ha permitido alcanzar un buen nivel de especialización en este ámbito en torno al cual proyectamos una importante actividad futura.

VI.2.2 Nuevas vacunas

Según se comentó, la primera aplicación de las nanopartículas en los años 70, se centró específicamente en la liberación de vacunas. Si bien en los 80 no se apreciaron avances significativos en esta línea, en los 90 hubo un resurgimiento de este interés que vino motivado por la confianza que instituciones tales como la OMS y la Fundación Gates mostraron en las tecnologías de liberación. En efecto, dichas tecnologías han sido vistas como una vía para resolver problemas acuciantes que afectan de forma prioritaria a los países menos desarrollados. Estos problemas van desde la necesidad de inyecciones múltiples hasta la falta de vacunas eficaces para numerosas enfermedades entre las que destaca la malaria. De este modo, nuestro grupo de investigación fue elegido para trabajar en el programa de Grandes Retos en Salud Global de la Fundación Gates con el objetivo de desarrollar vacunas más eficaces con un menor número de inyecciones o incluso eliminando la forma inyectable. Para ello, se eligió la vacuna de la hepatitis constituída por nanopartículas de una proteína unida a fracciones lipídicas y se planteó el reto de asociarla a nanoestructuras poliméricas de dimensión superior. Gracias al trabajo realizado por las doctorandas Sara Vicente y Patricia Paolicetti y la Dra. Prego, en colaboración con el Prof. Sánchez, y la Prof. Africa, al día de hoy podemos afir-

mar que disponemos de vehículos capaces de dar respuestas frente al antígeno de la hepatitis B, superiores y más prolongadas que la formulación actualmente comercializada (antígeno adsorbido en aluminio), lo que sugiere su interés como vacuna monodosis. Asimismo, se consiguieron respuestas protectoras tras la administración de algunos prototipos por vía nasal, lo que revela su potencial como vehículos no inyectables (Prego, 2010).

Después de varias décadas de investigación, y fruto de los esfuerzos que en esta línea ha desarrollado el sector industrial, existen varias formulaciones comercializadas o en fase de desarrollo clínico, que ponen de manifiesto la aplicación de los sistemas de liberación en el desarrollo de nuevas vacunas. Algunas de estas formulaciones se describen a continuación.

EPAXAL®: vacuna de la hepatitis A basada en la tecnología PeviPRO™, desarrollada por los laboratorios Berna. Es una tecnología que parte del concepto de virosoma, que son estructuras liposomales que contienen glicoproteínas virales, hemaglutinina y neuraminidasa aisladas del virus de la gripe inactivado, convenientemente insertadas en su superficie. Se trata de nanoestructuras que mimetizan las partículas virales («virus-like particles).

INFLEXAL®: vacuna de influenza basada en la tecnología PeviPRO™.

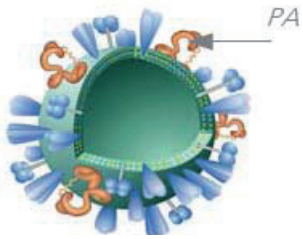


Figura 16. Estructura de un virosoma obtenido según la tecnología PeviPRO™. PA: antígeno peptídico.

MF59™: representa una serie de adyuvantes de la firma Novartis basadas en nanoemulsiones de escualeno convenientemente estabilizadas. Han sido comercializadas como formulaciones de vacunas de la gripe estacional y pandémica (FLUAD® y FOCETRICIA®). Además se encuentran en fase de evaluación clínica como formulaciones de una serie de antígenos, entre otros: HIV, HCV, parvovirus y citomegalovirus *(Schultze,2008)*.

ASO2 y AS03™: representan una series de adyuvantes de la firma GKS basadas en el uso de nanoemulsiones, que han sido propuestas para la formulación de la vacuna de la gripe (PANDEMRIX®) y la vacuna de malaria, ésta última en fase de investigación clínica (Garçon, 2007).

AF03 ™ hace referencia al adyuvante de la firma Sanofi-Aventis presentado igualmente bajo la forma de emulsión de escualeno. Existe una formulación de la vacuna de la gripe comercializada (HUMENZA).

Además de estas formulaciones existen otras varias **en fase de investigación clínica**, entre las que destacan:

MONTANIDE™ series: son emulsiones basadas en escualeno, actualmente aprobadas para uso veterinario que se están siendo evaluadas en fases clínicas I/II para su uso frente a malaria, influenza y en distintas fases I/II/III para el tratamiento de diversos cánceres (leucemia, melanoma, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer mama, cáncer ovario).

ISCOM® e ISCOMATRIX® (immune-stimulating complex). Son estructuras tipo jaula que combinan colesterol, fosfolípidos y un adyuvante tipo saponina (Quil A), así como el componente antigénico. Están en desarrollo clínico (fases I/II) frente a HIV y HPV.

STIMUVAX®: se trata de una vacuna terapéutica consistente en liposomas que contienen un lipopéptido dirigido específicamente al antígeno MUC1 típico de cáncer de pulmón de células grandes. Se han ensayado en fases clinicas II/III:

PROTOLLIN®: se trata de nanopartículas compuestas por proteínas de *Neisseria meningitidis* (proteosomas) complejadas de forma no covalente con LPS. Han sido evaluadas clínicamente para la inmunización por vía nasal frente a influenza (Fase I).

VI.2.3 Terapias génicas

Como se señaló anteriormente el concepto de terapia génica ha suscitado grandes expectativas acompañadas de ciertas decepciones. Sin embargo, el análisis de los resultados y el elevado número de ensayos clínicos en fase de desarrollo nos lleva a considerar el interesante potencial de este tipo de terapias. En efecto, esta opción terapéutica está siendo aplicada en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, mayoritariamente cáncer, pero también enfermedades cardiovasculares, neurológicas, infecciosas y oculares. Asimismo, y basándose en el mismo concepto, está cobrando un notable interés la vacunación genética (Silva, 2009). Con todo, es importante destacar el hecho que los resultados obtenidos hasta el momento con nanoestructuras sintéticas están lejos del éxito logrado con los vectores virales. Así, en un estudio recientemente publicado en el Journal of gene medicine se indica que cerca del 50% de los ensayos clínicosen desarrollo utilizan vectores virales (adenovirus, retrovirus y virus adeno-asociados), mientras que los vectores lipídicos y otros tipos de vectores sintéticos no llegan a alcanzar la cifra del 10% (Journal of Gene Therapy: http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/).

A continuación se describen las terapias génicas que han sido objeto de desarrollo y comercialización:

VITRAGENE®: oligonucleótido antisentido indicado en el tratamiento de la retinitis causada por cytomegalovirus en pacientes con sida. Desarrollado por la empresa Novartis, fue aprobado por la FDA en 1998 y posteriormente por la EMEA. Sin embargo, su comercialización ha sido interrumpida debido a la escasa incidencia de esta enfermedad y porque ha sido desplazado en su indicación por un nuevo tratamiento:

MACUGEN®: oligonucleótido antisentido modificado químicamente con PEG que inhibe la actividad del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF165). Desarrollado por Pfizer y aprobado por la FDA en el 2004, y por la EMEA en el 2006. Está indicado para el tratamiento de la degeneración macular neovascular (exudativa) asociada a la edad (DMAE).

GENDICINE®: terapia adenoviral indicada en el tratamiento de procesos tumorales mediados por disfunciones en el gen codificador de la proteina p53, desarrollada por la empresa (Chinese Shenzhen SiBiono Genetechnologies) y aprobada en China para su uso clínico en el tratamiento del cáncer de cuello y cabeza en 2003.

ENCORINE®: terapia indicada en el tratamiento de procesos tumorales mediados por disfunciones en el gen codificador de la proteina p53, desarrollada por la empresa Shanghai Sunway Biotech y aprobada para su uso clínico en 2005.

Un acontecimiento particularmente importante en terapia génica, y que guarda estricta relación con los vectores sintéticos, es el descubrimiento de la existencia del RNA interferente. Este descubrimiento ha merecido el premio nobel de medicina, con-

cedido a Andrew Fire y Cragi Mello en el año 2006. Los denominados siRNA (small interferent RNA) son RNA de doble cadena y, en general, de peso molecular más pequeño que los plásmidos ADN. El siRNA actúa a nivel del mRNA reduciendo la síntesis de la proteína causante de la enfermedad. En principio, todas las enfermedades causadas por la actividad de uno o varios genes pueden ser tratadas mediante RNAi.

Además de su diferencia con los pDNA en tamaño y mecanismo de acción, existen dos aspectos fundamentales que inducen a pensar en un interesante potencial terapéutico para el siRNA. Por un lado, el método habitual para producir siRNA es mediante síntesis química. Desde un punto de vista regulatorio, el siRNA entra en la categoría de fármaco, entendiéndose como tal a una estructura química facilmente analizable tras su síntesis. Por el contrario, la mayoría de los productos de terapia génica entran en la categoría de productos biológicos, siendo los requerimientos para su desarrollo superiores a los correspondientes a un fármaco. Por otro lado, la vehiculización del siRNA no puede ser llevada a cabo por vectores virales como ocurre en el caso de pDNA, pero puede ser llevada a cabo de forma más sencilla haciendo uso de vectores sintéticos.

Estos aspectos diferenciales justifican el hecho de que a pesar de su escaso tiempo de desarrollo, exista a día de hoy una abundante bibliografía al respecto (Martinprey, 2009; Whitehead, 2009) además de numerosas formulaciones en ensayos clínicos, entre las que destacan las que se recogen en la tabla.

Tabla 1: Ensayos clínicos que se encuentran en desarrollo con siRNA. (---) Administrados en solución salina.

Compañía	siRNA	Tratamiento	Vía administración	Formulación	Fase clínica
Opko Health	Bevasiranib	Degeneración macular asociada a la edad	Intravitrea	---	Fase III
		Edema diabético macular	Intravitrea	---	FaseII
Alnylam Pharmaceuticals	ALN-RSV01	Virus sincitial respiratorio	Intranasal	---	Fase II
Allergan	Sirna-027 (AGN211745)	Degeneración macular asociada a la edad	Intravitrea	---	Fase II
Quark Pharmaceuticals, and Silence Therapeutics	RTP801i-14	Degeneración macular asociada a la edad	Intravitrea	----	FaseI
	I5NP	Fallo renal agudo	Intravenosa	---	FaseI
	Atu027	Tumor sólido	Intravenosa	Lipidica	FaseI
Calando Pharmaceuticals	CALAA-01	Tumor sólido	Intravenosa	Nanopartícula polimérica	Fase I
Nucleonics	NUC B1000	Virus hepatitis B	Intravenosa	Lípidos catiónicos	Fase I
TransDerm	TD101	Pachyonychia congénita	Intradérmica	---	Fase I

En este punto, merece la pena destacar la contribución de nuestro grupo de investigación al desarrollo de nuevos vehículos para el transporte de material genético. Nuestra actividad se inició en el 2000 con el desarrollo de nanopartículas de PLGA capaces no únicamente de transportar el material genético sino también de liberarlo de forma controlada en el interior de la célula (Celso, 2001). Este trabajo, que constituyó la tesis doctoral de Celso Pérez, fue continuado por las doctorandas Noemi Csaba, quien puso de manifesto la importancia de esos vehículos para la immunización genética por vía nasal (Csaba, 2006) y por María de la Fuente, quien desarrolló nuevos vehículos de terapia génica particularmente adaptados para la vía ocular (De

la Fuente, 2008). Estos trabajos, desarrollados en colaboración con Alejandro Sánchez y Begoña Seijo, han desenbocado en un trabajo reciente de Manuela Raviña orientado al desarrollo de vehículos de especial interés para el transporte de siRNA. En este último, han participado igualmente los grupos de la Dra. Cano y el Dr. Riguera.

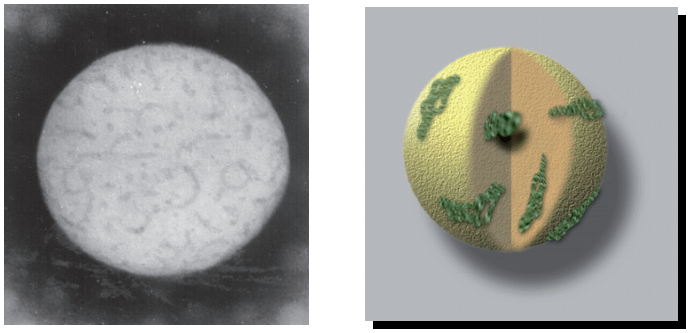


Figura 17. Ilustración simulada e imagen tomada en el microscopio electrónico de transmisión de una nanopartícula de PLGA conteniendo pDNA

VII
EL FUTURO DE LOS NANOSISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

Hemos apreciado en el capítulo anterior como, a lo largo de la última década, los nanomedicamentos se han ido introduciendo en el mercado. Es bien cierto que, comparado con la totalidad del mercado farmacéutico, estas nuevas terapias representan únicamente un pequeño nicho. Sin embargo, el punto fuerte de estas tecnologías es su gran versatilidad y su capacidad para incorporar nuevas funciones a los medicamentos. Por eso, estamos asistiendo a un crecimiento gradual del interés de la industria farmacéutica, como lo demuestran el incremento exponencial en el número de patentes en la pasada década. Hemos de reconocer, sin embargo, que existen dudas importantes, en relación con los aspectos regulatorios, derivadas de un desconocimiento en profundidad de las nanoestructuras y de su comportamiento en un entorno biológico. A pesar de ello, en conjunto, el análisis de la evolución de la nanotecnología farmacéutica o de la nanofarmacia, como se indica en el último documento elaborado por la plataforma europea de nanomedicina, nos lleva a prever un futuro muy prometedor. Según el documento de hoja de ruta elaborado por la plataforma, los logros en esta línea vendrán altamente determinados por la comunicación y cooperación entre el entorno académico, las pequeñas empresas derivadas de la investigación y las grandes

farmacéuticas. Poner en práctica la innovación abierta («open innovation») parece crítico para la adecuada traslación del conocimiento básico al producto.

Los ámbitos de actuación dirigidos al desarrollo de nuevas terapias basadas en la nanociencia y la nanotecnología, en las décadas que siguen podrían situarse en:

- El desarrollo de nuevos biomateriales y nanoestructuras. Siguiendo la tendencia reciente es previsible el desarrollo de nuevas nanoestructuras biomiméticas (Carmona-Ribeiro, 2010), ideadas a partir del conocimiento del comportamiento de sistemas biológicos, así como nanosistemas que responden a estímulos biológicos y estímulos activables externamente, a los que se ha denominado sistemas inteligentes (Alvarez-Lorenzo y Concheiro, 2008, 2009). La traslación de estos sistemas a la práctica clínica se producirá en la medida en que las nuevas nanoestructuras cumplan los requisitos de biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad, aspectos clave desde la perspectiva regulatoria. En este marco de actividad, y a pesar del interés que actualmente suscitan los materiales inorgánicos, es previsible un mayor desarrollo de los materiales poliméricos (polímeros lineales y dendrímeros), lipídicos y proteínicos.

- Desarrollo de nuevas metodologías sencillas, inocuas y fácilmente escalables. En esta línea, y a pesar del ingente número de tecnologías complejas desarrolladas en los últimos años, es previsible una tendencia a la simplicación que lleva asociado un mayor interés, por parte de la empresa, en su posterior desarrollo farmacéutico. Asimismo, la investigación en esta línea deberá dirigirse a tecnologías que aporten un gran rendimiento en la obtención del producto.

- En cuanto a los ámbitos de aplicación, y siguiendo la corriente de las últimas tres décadas, es previsible un avance

notable en el **desarrollo de sistemas de transporte y liberación de macromoléculas a través de barreras biológicas**. Este es concretamente un ámbito en el que se pretende actuar desde el 7º programa marco de la comisión europea. Más concretamente, se pretende realizar un análisis integral de una amplia gama de nanoestructuras en relación con su capacidad para atravesar barreras biológicas complejas tales como la barrera sangre-cerebro, las barreras mucosas (oral, nasal, pulmonar, ocular) y la piel. Es previsible que el conocimiento generado permita desarrollar terapias más eficaces y más fáciles de administrar. Los correspondientes sistemas nanotransportadores podrían ser de aplicación en la administración de péptidos, ej. insulina, polisacáridos, ej. heparina, proteinas, anticuerpos monoclonales y fragmentos polinucleotídicos y en particular siRNA.

- En cuanto a las terapias susceptibles de obtener un mayor beneficio de la aproximación nanotecnológica destacan principalmente:

a) Terapias oncológicas basadas en moléculas de bajo peso molecular, pero también proteínas, anticuerpos monoclonales y si RNA. Los nanotransportadores aportarán una mayor selectividad y eficacia a estos tratamientos.
b) Terapias cardiovasculares dirigidas a la localización de nanoestructuras en regiones de interés a nivel cardíaco y circulatorio.
c) Terapias antiinflamatorias, que tendrán especial interés en el tratamiento de mucosas y cavidades articulares.
d) Terapias neurológicas, dirigidas principalmente a atravesar la barrera sangre-cerebro.
e) Terapias locales: dérmicas, oculares, pulmonares. Este será un ámbito de especial aplicación desde la perspectiva de la terapia génica y el tratamiento de procesos inflamatorios, infecciones y, en general, relacionados con el sistema inmune.
f) Vacunas: es esperable que la nanomedicina contribuya

de forma contundente al desarrollo de nuevas vacunas, tanto de origen biotecnológico como vacunas genéticas, así como al incremento significativo de vacunas terapéuticas. La asociación de antígenos junto con componentes inmunoestimulantes bajo la forma de nanoestructuras permitirá mejorar la capacidad protectora de las vacunas, a la vez que una más fácil adminsitración.

Desde una perspectiva clínica global se prevé que la nanomedicina permita la comercialización de fármacos complejos, cuyas características los hacen desechables en el momento actual. De este modo, es previsible un gran desarrollo de las macromoléculas, así como de otros fármacos de pequeño tamaño que presenten problemas de solubilidad, polaridad o inestabilidad.

Desde la perspectiva económica cabe señalar que se espera que el mercado farmacéutico europeo de genéricos se duplique de aquí al 2015 (de 270 a 500 billones de euros, de un total de 820 millones de euros de gasto farmacéutico europeo actual), lo que conllevará la necesidad de buscar nuevas fuentes de patentes e ingresos. La nanomedicina, se presenta, por tanto, como una fuente especial de innovación, de desarrollo del tejido empresarial y de mejora de la calidad de vida de los pacientes.

En un estudio publicado recientemente, se señala que el área de los nanosistemas de liberación de fármacos, que en la actualidad cuenta con 28 productos comercializados (cancer, vacunas, infecciones, degeneración macular, acromegalia, esclerosis múltiple, immunosupresores, antieméticos, reguladores lipídicos), representará en el 2012 un mercado próximo a los 10 billones de dólares (Wagner, 2006). Esta expectativa será notablemente mejorada si se consiguen las mencionadas alianzas entre el sector público, la pequeña y la gran empresa y la requerida comunicación de las agencias regulatorias.

Y con este escenario, probablemente impregnado del tono optimista que nos caracteriza a los investigadores, finaliza mi discurso. Un discurso que, como anticipé, no pretende ser un análisis exhaustivo y veraz de la evolución de la Farmacia Galénica, sino simplemente una visión personal de los hitos y hallazgos científicos que me han impresionado y han marcado, en definitiva, mi trayectoria profesional. A esta visión, han contribuido mis maestros, pero también mis colaboradores y discípulos a quienes reitero mi agradecimiento.

DISCURSO DE CONTESTACIÓN

«Sólo es posible avanzar cuando se mira lejos.
Solo cabe progresar cuando se piensa en grande.»
José Ortega y Gasset

Excmo Sr Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia
Excmas Sras y Excmos Sres Académicos
Sras y Sres

Tras la lectura de su discurso de ingreso me corresponde, y ésta es la tercera vez que lo hago, hacer la contestación y dar la bienvenida a un nuevo académico que ingresa en ésta corporación: Si ello ha constituido siempre un motivo de satisfacción en el caso del acto de hoy creo que se dan una serie de especiales circunstancias que incrementan ésta satisfacción. En primer lugar, las aulas de la Facultad de Farmacia, siempre han contado con un porcentaje muy notable de mujeres y ya iba siendo hora que se incorporase a ésta Academia una tercera mujer; ésta baja proporción de 3 mujeres frente a 12 varones quedaría mas compensada si introducimos un factor de ponderación mediante el cual se tenga en cuenta sus valías profesionales. En segundo lugar ésta tercera mujer es la Profesora María José Alonso Fernández considerada como uno de los 25 investigadores más influyentes de España según ha publicado el diario EL MUNDO a lo largo de los últimos tres años y es precisamente éste hecho el que me ha llevado a proponer el anteriormente mencionado factor de ponderación. Finalmente existe una ter-

cera circunstancia, para mí muy especial, y es que María José ha sido probablemente mi alumna mas distinguida y con el paso de los años ella se ha convertido en la persona de la que he ido aprendiendo al leer sus excelentes trabajos; cierro así un ciclo evolutivo profesional que se inició siendo yo alumno del prof Cadórniga, continuó con mis años de profesor universitario, en los que traté de inculcar mis conocimientos y experiencias, movilizando voluntades y tratando de abrir las mentes a la idea de que las ciencias farmacéuticas tienen como última finalidad acercar los logros científicos de la Farmacia al paciente y tras un largo periodo éstos años se cierran siendo nuevamente alumno, espero que aventajado, de una de mis discípulas. Sinceramente creo que una de las mayores satisfacciones de un profesor es poder contemplar que uno de sus alumnos destaca y alcanza altas cotas en el desarrollo de su actividad profesional porque, como docente, considero que ello no es un demérito sino que tal vez, en mi caso, constituya mi mejor contribución a la sociedad universitaria en la que me encuadro.

Si he aceptado con plena satisfacción hacer el discurso de contestación al de la Profesora María José Alonso Fernández también debo manifestar mi inquietud por si mis palabras no pueden reflejar serenamente, y en algunos minutos, sus rasgos humanos y científicos mas destacados. En unos casos, por lo anteriormente expuesto, les parecerán exageradas mis palabras porque están dichas sub specie amoris, es decir enfocadas preferentemente con la óptica del afecto; en otros casos, por mis propias limitaciones, puede que no esté a la altura del discurso que acaba de leer la nueva académica.

En cualquier caso, no creo que importen estas reflexiones, por cuanto es protocolario en éstos actos reiterar alguna información tanto mas cuanto que, como en éste caso, supone un aleccionador ejemplo de verdad.

Respecto a la verdad, cinco son las virtudes que Berthold Brecht atribuye a los correctos narradores: valor para exponerla, sagacidad para conocerla, arte para expresarla, juicio para darle eficacia, astucia para propagarla. Y éstas me agradaría poseer para llevar a buen fin mi tarea en éste momento.

Nace María José en un pueblo de León situado en la ribera del Órbigo, Carrizo de la Ribera, un 22 de Diciembre fecha a la que probablemente se podrían aplicar los versos del poema Invierno del poeta afincado en León Antonio Gamoneda:

> La nieve cruje como pan caliente
> Y la luz es limpia como la mirada de al-
> gunos seres humanos

Realiza sus estudios de Bachillerato en el instituto de su población natal y tras un pequeño periodo dubitativo, rápidamente corregido por sus padres, se interesa por la química, la física y las matemáticas que unido a las visitas a una de las farmacias de la población le llevan a seleccionar Farmacia como carrera universitaria.

Terminado el Bachillerato comienza en 1976 sus estudios de Farmacia en Santiago de Compostela, terminándolos brillantemente en 1981 para realizar posteriormente su tesis doctoral que presenta en 1985 obteniendo el Premio Extraordinario. Tras un año como profesora encargada de curso, pienso que todo futuro profesor del Departamento debe realizar una estancia en un centro extranjero de reconocido prestigio y con tal fin María José se incorpora durante un año al Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de Paris Sud durante el cual también trabaja en el prestigioso centro Gustave Roussy. A su vuelta obtiene una plaza de Profesor Titular y en 1989 realiza una estancia de medio año en la Facultad de Farmacia de Angers como investigador visitante.

El año 1991 constituye una fecha clave en la formación de la profesora Alonso ya que obtiene una beca para trabajar durante año y medio en el Departamento de Ingeniería Química del Instituto Tecnológico de Massachusetts bajo la dirección del Profesor Bob Langer (Premio Príncipe de Asturias 2008 de Investigación Científica y Técnica), iniciando sus trabajos sobre microencapsulación de vacunas. Su trabajo es ampliamente reconocido en tan prestigioso centro de tal forma que inicia, a su vuelta a Santiago, una activa relación en proyectos de investigación que se concretan en diferentes publicaciones. A éste mismo centro, ya en calidad de invitada, regresa en el año 2000 para iniciar el desarrollo del proyecto «nanopartículas en terapia génica».

Estamos por tanto ante una investigadora, que en su etapa de formación, se ha ganado el reconocimiento de su trabajo y la amistad de prestigiosos investigadores en el mundo de la nanotecnologia como los Profesores Patrick Couvreur, el mencionado Bob Langer, Nicholas Peppas, Jean Pierre Benoit y un largo etc.

Fruto copioso y de calidad de su ardua y entregada acción investigadora son sus múltiples publicaciones. El balance de artículos de investigación publicados en revistas y de capítulos de libros de referencia internacional supone hasta el momento actual, la cantidad de 181. Entre ellos merecen especial mención:

- Año 2001: Premio de la revista European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics al mejor artículo publicado en 2001
- Año 2002: Mención especial del Comité Editorial de Elsevier Science por el artículo mas descargado de internet entre los publicados en la revista Journal of Controlled Release.
- Año 2005: Distinción de la American Chemical Society a un artículo por ser el cuarto mas descargado

por internet de entre los publicados por la revista Biomacromolecules a lo largo del año 2005

- Año 2006: Distinción de la Editorial Elsevier a un artículo por encontrarse entre los 25 mas descargados por internet de la revista Journal of Controlled Release.
- Año 2009: Premio de la revista European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics al artículo científico más citado en el periodo 2004-2008

Pero no es sólo importante el número de artículos sino el interés que los mismos han suscitado. María José Figura entre los científicos más citados en España en el área de Farmacología (**Factor H: 43**, más de 5,800 citas). Asimismo, ha participado como **conferenciante invitado** en **40 congresos** científicos de proyección internacional.

Esta labor investigadora se ha visto respaldada por 38 proyectos de investigación financiados, que van desde 1989 hasta la actualidad, varios de ellos concedidos por organismos tan prestigiosos como la OMS, la OTAN, la European Comisión (5 proyectos) o la Bill and Melinda Gates Foundation. En cuanto se refiere a su actividad de transferencia del conocimiento, cabe destacar su responsabilidad en la dirección de 9 contratos de investigación de especial relevancia con la industria farmacéutica, así como su participación en invenciones objeto de **12 patentes** internacionales, todas ellas licenciadas. Seis de estas patentes dieron lugar a la creación de la División Nanosystems de la empresa Advanced In Vitro Cell Technologies, S.A. (Advancell).

Con María José se han formado 18 doctores/as, 5 de los cuales son responsables científicos en la Industria farmacéutica, 9 han optado por la carrera científica y 4 ocupan cargos en el sector sanitario.

Finalmente cabe destacar su activa participación en sociedades científicas, redes y comités como fundadora y primera presidenta de la Sociedad Hispano-Portuguesa de liberación controlada, la Plataforma Tecnológica Española de Nanomedicina, de la que es responsable de la división de educación y comunicación, de la European Technology Platform of Nanomedicine, Red Galenos-Marie Curie, miembro del Comité de asesores en «Social and Ethical Issues-Grand Challenges in Global Health» de la fundación Bill and Melinda Gates o patrona de la Fundación de la Innovación Bankinter.

En ésta obligadamente corta exposición he intentado esquivar los escollos que, una y otra vez, salen al paso cuando se quiere hacer una glosa breve pero acertada de las relevantes características científicas de la Profesora Alonso. No obstante, y aun a riesgo de ser repetitivo, quiero concluir éste apartado diciendo que su extraordinaria actividad ha sido refrendada por el público aprecio a su persona y a sus hechos tanto en España como en el extranjero lo que le ha llevado a desempeñar labores de gestión y asesoramiento como el actual cargo de Vicerrectora de Investigación e Innovación de la Universidad de Santiago de Compostela y su participación como asesora del Ministerio de Ciencia e Innovación para la elaboración de la Ley de la Ciencia.

El discurso leído por la nueva académica recoge la impresionante evolución que ha sufrido la Tecnología Farmacéutica en los últimos cincuenta años. El término Farmacia Galénica, adoptado principalmente por los países de origen latino en honor a Claudio Galeno, está ligado desde hace muchos años a un conjunto de actividades y conocimientos relacionados con la manipulación de los principios activos y su adecuación para la administración al ser humano. Su razón de ser y su objetivo ha sido y sigue siendo el fármaco en su vertiente técnica y, desde éste punto de vista, su contenido ha permanecido invariable a

lo largo del tiempo. Pero aun reconociendo ésta identidad resulta evidente la gran transformación que ha sufrido en cuanto a los productos que manipula, metodología que utiliza y los objetivos concretos y específicos que persigue.

La primera transformación importante surge con la aplicación de los conceptos y metodología fisicoquímica al diseño y elaboración de las diferentes formas de dosificación (la Physical Pharmacy anglosajona) que dieron lugar a los estudios de inestabilidad de los principios activos en las formas de dosificación y, consecuentemente, al establecimiento de una fecha de caducidad para las diferentes formulaciones.

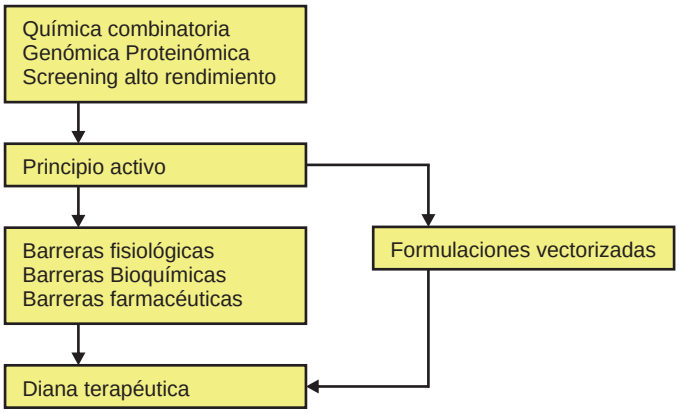
La aparición de la Biofarmacia y Farmacocinética ha supuesto el considerar como imprescindible el conocimiento de los eventos del principio activo en el organismo humano (medio biológico) lo que ha supuesto que los criterios biofarmacéuticos pasan a representar un papel primordial en la formulación y desarrollo de las formas de dosificación. La aplicación de los principios fisicoquímicos y los conocimientos aportados por la Biofarmacia y la Farmacocinética han supuesto que la Tecnoloia Farmacéutica, aun conservando el término de tecnología, sea considerada actualmente como una verdadera ciencia.

Al estudiar la evolución en el tiempo de los niveles plasmáticos de un fármaco se observa, con las formulaciones convencionales, un rápido aumento, un máximo y un descenso gradual de los mismos. Con frecuencia éstos niveles plasmáticos se mantienen efectivos durante un corto periodo de tiempo lo cual obliga a un aumento de la dosis, con la posible aparición de efectos secundarios, o tener que repetir la dosis a intervalos cortos de tiempo. Actualmente, en las sociedades desarrolladas, son cada vez más numerosas las personas que tienen mas de 75 años y cuánto mas envejecen las personas mas medicamentos se

les prescriben y más les cuesta respetar tratamientos complejos en los que a menudo alternan tres, cuatro o cinco productos.

El profesor Joseph Robinson de la Universidad de Wisconsin estableció que en la respuesta producida por los medicamentos se deben considerar dos aspectos: tiempo que permanece el fármaco en su lugar de acción (aspecto temporal) y la cantidad de fármaco que llega a su diana terapéutica (aspecto espacial). Las formulaciones convencionales no permiten controlar éstos dos aspectos por lo que mayoritariamente en la década de los años 1980 se desarrollaron nuevas estrategias y sistemas que tenían como finalidad conseguir una optimización de la liberación del principio activo con el objetivo de modificar el aspecto temporal, por medio de lo que actualmente se conoce como liberación controlada dando lugar al desarrollo de nuevas formas de dosificación de medicamentos y a la administración de éstos a través de nuevas vías como la nasal, transdérmica, colónica, pulmonar, etc.

En las últimas décadas ha tenido lugar un espectacular desarrollo de la biologia celular y molecular que ha permitido no solo un mejor conocimiento de la fisiopatologia de numerosos procesos patológicos sino también la identificación de diversas dianas terapéuticas con el consiguiente desarrollo de nuevos fármacos cuya estructura va desde sencillas moléculas a complejas macromoléculas como proteínas o plásmidos. Estas moléculas, tal como se recoge en la Figura 1.1, pueden tener actualmente un variado origen pero con frecuencia presentan problemas de solubilidad y, para alcanzar una adecuada biodisponibilidad biofásica (en fármacos con elevada actividad intrínseca puede ser suficiente un 10%) deben poseer unas propiedades fisicoquímicas que les permitan atravesar las barreras fisiológicas, como son los epitelios, membranas celular y nuclear, así como ser estables tanto física como químicamente en fluidos biológicos.



Obviar éstas barreras fisiológicas, bioquímicas y farmacéuticas se ha convertido en el centro de atención de la ciencia de liberación de fármacos al organismo por medio de lo que actualmente se conoce como vectorización de fármacos (aspecto espacial) ya que modificando las características farmacocinéticas y de biodistribución de los principios activos es posible aumentar su eficacia y restringir la toxicidad asociada a su biodistribución en tejidos en los que no interesa que se alcancen determinados niveles de fármaco.

Las finalidades que se persiguen con los nuevos sistemas de liberación de fármacos podrían resumirse en los siguientes puntos:

- Incrementar la hidrosolubilidad de fármacos poco solubles mediante el empleo de, por ejempo, nanocristales o micelas poliméricas.
- Proteger al fármaco de su degradación, tanto física como química, aspecto esencial cuando se piensa en la utilización de los nuevos principios activos procedentes del área de la biotecnología.
- Incrementar la absorción de fármacos facilitando su difusión a través de los epitelios, aspecto de importancia relevante cuando se trata de buscar alternativas a la administración parenteral de fármacos.

- Modificar las características farmacocinéticas de los fármacos y con ello su perfil de distribución a ciertos tejidos u órganos bien para incrementar su eficacia o disminuir efectos indeseables.
- Incrementar la penetración y distribución intracelular que son necesarias cuando la diana sobre la que va a actuar el fármaco se encuentra en el interior de la célula.

Hoy día la nanotecnología farmacéutica, la última transformación profunda que ha sufrido la tecnología farmacéutica, aun siendo una ciencia típicamente farmacéutica por su contenido y su finalidad, sin embargo trabajan en ella investigadores de muy diversas áreas: bioquímicos, físicos, químicos de polímeros, etc sin que ello suponga una merma o intromisión en nuestra actividad profesional. Haciendo un símil musical podríamos decir que el médico seria el compositor de la partitura, los solistas los profesionales de muy diversas áreas y el farmacéutico que, como un buen director, no necesita dominar un instrumento pero es indispensable que sea músico con criterio de conjunto, que conozca las posibilidades de cada instrumento y las relaciones e influencias que sobre los demás puede ejercer en el conjunto de los acordes orquestales.

Querida Maria José, dentro de unos momentos vas a recibir la medalla que te acredita como Académica de Número de ésta Corporación; es pues hora de proclamar la excelente adquisición que hoy celebra ésta Academia con tu incorporación así como felicitarte por el excelente discurso de ingreso el cual no es más que el reflejo de una larga trayectoria profesional que deseamos continúe desarrollándose en ésta institución.

REFERENCIAS

Abuchowski A., McCoy J.R., Palczuk N. C., van Es T., Davis F.F., Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on inmunogenicity and circulating life of bovine liver catalase, J. Biol. Chem., 252, 3582-3586 (1977)

Al Khouri Fallouh N., Roblot-Treupel L., Fessi H., Devissaguet J. Ph., Pusieux F., Development of a new process for the manufacture of polyisobutyl-cyanoacrylate nanocapsules, Int. J. Pharm., 28, 125-132 (1986)

Allen M.T., Hansen C.B., Rutledge J., Liposomes with prolongued circulation times: factors afecting uptake by reticuloendothelial and othe tissues, Biochem. Biophys. Acta, 981, 27-35 (1989)

Allen T.M., Cullis P.R., Drug delivery systems: entering the mainstream, Science, 303, 1818-1822 (2004)

Alonso M. J., Cohen S., Park T.G., Gupta R. K., Siber G., Langer R., Determinants of the release of tetanus toxoid from polyester microspheres, Pharm. Res., 10, 945-953 (1993)

Alonso M. J., Gupta R. K., Min C., Siber G., Langer R., Biodegradable microspheres as controlled release tetanus toxoid delivery systems, Vaccine , 12, 299-306 (1994)

Alonso M.J., Sánchez A., The potential of chitosan in ocular drug delivery, J. Pharm. Pharmacol., 55, 1451-1663 (2003)

Alphandary H., Andremont A., Couvreur P., Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications, Antimicrobial Agents, 13, 155-168 (2000)

Alvarez-Lorenzo C., Bromberg L., Concheiro A., Light-sensitive intelligent drug delivery systems, Photochem. Photobiol., 85(4), 848-860 (2009)

Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A., Intelligent drug delivery systems: Polymeric micelles and hydrogels, Mini Rev. Med. Chem., 8(11), 1065-1074 (2008)

Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C., Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids, J. Mol. Biol. 13, 238-252 (1965)

Birrenbach G., Speiser P.P., Polymerized micelles and their use as adjuvants in inmunology, J. Pharm. Sci., 65, 1763-1766 (1976)

Birrenbach, G., Über Mizellpolymerisate, mögliche Einschulussverbindungen (Nanokapseln) und deren Eignung als Adjuvatien, Dissertation ETH, Zürich, 5071 (1973)

Blanco D., Alonso M. J., Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres, Eur. J. Pharm. Biopharm., 43, 287-294 (1997)

Brazile D., Prud'homme C., Bassoullet M.T., Marlard M., Spenlehauer G., Veillard M., Stealth MePEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocyte system, J. Pharm. Sci., 84, 493-498 (1995)

Brigger C., Dubernet C., Couvreur P., Nanoparticles in cancer therapy and diagnostics, Adv. Drug. Del. Rev., 54, 631-651 (2002)

Calvo P. y Vila-Jato J.L., Cancer, Nanotecnología Farmacéutica, Realidades y Posibilidades Farmacoterapéuticas, Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XXVIII, Ed. José Luis Vila Jato, ISBN: 978-84-936890-8-7 (2009)

Calvo P., Remuñán-López C., Vila-Jato J.L., Alonso M. J., Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines, Pharm. Res., 14, 1431-1436 (1997)

Calvo P., Remuñán-López C., Vila-Jato J.L., Alonso M., Development of positively charged colloidal drug carries: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions, Colloid. Polymer Sci. 275, 46-53 (1997)

Calvo P., Thomas, Alonso M.J., Vila Jato J.L., Robinson J., Study of the mechanisms of interaction of poly-E-caprolactone nanocapsules with the cornea by confocal laser scanning microscopy, Int. J. Pharm., 103, 283-291 (1994)

Carmona-Ribeiro C., Biomimetic nanoparticles: preparation, characterization and biomedical applications; Int. J. Nanomedicine, 5, 249-259 (2010)

Couvreur P., Kanté B., Grislain L., Roland M., Speiser P., Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II. Doxorubicin-loaded nanoparticles, J. Pharm. Sci., 71, 790-792 (1982)

Couvreur P., Kanté B., Lenaerts V., Scailteur V., Roland M., Speiser P., Tissue distribution of antitumor drugs associated to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles, J. Pharm. Sci., 69, 199-202 (1980)

Couvreur P., Kante B., Roland M., Guiot M., Baudhin P., Speiser P., Polycyanoacrylate nanocapsules as potentially lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties, J. Pharm. Pharmacol., 31, 331-332 (1979)

Couvreur P., Kanté B., Roland M., Speiser P., Adsorption of antineoplastic drugs to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and their release characteristics in calf serum medium, J. Pharm. Sci., 68, 1521-1524 (1979)

Couvreur P., Tulkens P., Roland M., Trouet A., Speiser P., Nanocapsules: a new type of lysosomotropic carrier, FEBS Letters, 84, 323-326 (1977)

Csaba N., García Fuentes M., Alonso M.J., The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery, Expert Opin. Drug Deliv., 3, 463-478 (2006)

Csaba N., García Fuentes M., Alonso M.J., Nanoparticles for nasal vaccination, Adv. Drug Deliv. Rev., 61, 140-157 (2009)

Csaba N., Sanchez A., Alonso M.J., PLGA: Poloxamer and PLGA: Poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery, J. Control Rel., 113, 164-172 (2006)

Cuña M., Alonso-Sande M., Remuñán-López C., Pivel J.P., Alonso-Lebrero J.L., Alonso M.J., Development of Phosphorylates Glucomannan-Coated Chitosan Nanoparticles as Nanocarriers for Protein Delivery, J. Nanosci. Nanotechnol., 6, 2887-2895 (2006)

Damgé C., Michel C., Aprahamian M., Couvreur P., New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier, Diabetes, 37, 246-251 (1988)

Danson S., Ferry D., Alakhov V., Margison J., Kerr D., Jowle D., Brampton M., Halbert G., Ranson M., Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicine (SP1049C) in patients with advanced cancer, Br. J. Cancer, 90, 2085-2091 (2004)

Davis, F.F., The origin of pegnology, Adv. Drug. Del. Rev., 54, 457-458 (2002) (Important recent review that describes the pioneering research that opened the field of PEGylation)

De Campos A., Sánchez A., Gref. R., Calvo P., Alonso M.J., The effect of a PEG coating vs. a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa, Eur. J. Pharm. Sci., 20, 73-81 (2003)

De Campos A.M., Diebold Y., Carvahlo E.S., Sánchez A., Alonso M.J., Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: in vitro stability, in vivo fate and cellular toxicity, Pharm. Res., 21, 803-810 (2004)

De la Fuente M., Seijo B, Alonso M.J., Bioadhesive hyaluronan-chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue, Gene Ther., 15, 668-676 (2008)

De la Fuente M., Raviña M., Paolicelli P., Sanchez A., Seijo B., Alonso M.J., Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics, Adv. Drug Deliv. Rev., 62, 100-117 (2010)

De la Fuente M., Seijo B., Alonso M.J., Novel Hyaluronic Acid-Chitosan Nanoparticles for Ocular Gene Therapy, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 49, 2016-2024 (2008)

De Martimprey H., Vauthier C., Malvy C., Couvreur P., Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA, Eur. J. Pharm. Biopharm., 71(3), 490-504 (2009)

Ehrlich P., Collected studies on Immunology, John Wiley, New York, 442-447 (1906)

Enriquez de Salamanca A., Diebold Y., Calonge M., Garcia-Vazquez C., Callejo S., Vila A., Alonso M. J., Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 47, 1416-1425 (2006)

Faraji A.H., Wipt P., Nanoparticles in cellular drug delivery, Bioorg. Med. Chem., 17, 2950-2962 (2009)

Farokhzard O.C., Langer R., Impact of nanotechnology on drug delivery, ACS Nano, 3, 16 (2009)

Fenske D.B., Chonn A., Cullis P.R., Liposomasl Nanomedicines : an emerging field, Toxicologic Pathology, 36, 21-29 (2008)

Fernández Urrusuno R., Calvo P., Remuñán-López C., Vila Jato J.L., Alonso M.J., Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles, Pharm. Res., 16, 1576-1581 (1999).

Fitzgerald P., Handgraft J. Kreuter J., Wilson C.G., A scintigrapjic evaluation of microparticles ophthalmic delivery sustems: liposomes and nanoparticles; int. J. Pharm. 40, 81-84 (1987)

Folkman J., Long M.D., The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy, J. Surg. Res., 4, 139-142 (1964)

Gabizon A., Paphadjopoulus D., Liposome formulations with prolongued circulation time in blood and enhanced uptake in tumours, Proc. Natul. Acad. Sci., 85, 6949-6953 (1988)

Garcia-Fuentes M., Torres D. and Alonso M. J., New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin, Int. J. Pharm., 296, 122-132 (2005)

Garçon N., Chomez P., Van Mechelen M., GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives, Expert Rev. Vaccines, 6(5), 723-739 (2007)

Gaspar M., Blanco D., Cruz M.E.M., Alonso M. J., Formulation of L-asparginase loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release, J. Control. Rel., 52, 53-62 (1998)

Gonzalo T., Muñoz-Fernandez A., Dendrímeros y sus aplicaciones terapéuticas, , Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XXVIII, Ed. José Luis Vila Jato, ISBN: 978-84-936890-8-7 (2009)

Gordon A.N., Fleagle JT., Guthrie D., Parkin D.E., Gore M.E., Lacave A.J., Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan, J. Clin. Oncol., 19, 3312-3322 (2001)

Goycoolea F.M., Higuera-Ciapara I. & Alonso M.J. Chitosan-polysaccharide blended nanoparticles for controlled drug delivery, Handbook on Natural-based Polymers for Biomedical Applications, Eds. Rui L. Reis. Sections Editors: Nuno M. Neves, Joao F. Mano, Manuela E. Gomes, Alexandra P. Marques and Helena S. Azevedo. Woodhead International Ltd, Cambridge, U.K. pp. 544-679. 2008

Gref R., Minamitake Y., Peracchia M., Trubetshoy V., Torchilin V., Langer R., Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres, Science, 263, 1600-1603 (1994)

Grislain L., Couvreur P., Lenaerts V., Roland M., Deprez-De Campenere D., Speiser P., Pharmcokinetics and distribution of biodegradable drug-carrier, Int. J. Pharm., 15, 335-345 (1983)

Gurny R., Peppas N.A. Harrington D.D., Banker G.S., Development of biodegradable and injectable lattices for controlled release of potent drugs, Drug Dev. Ind. Pharm., 7, 1-25 (1981)

Harivardhan R., Couvreur P., Squalene: a natural triterpene for use in disease management and therapy, Adv. Drug Deliv. Rev., 61(15), 1412-26 (2009)

Harmia T., Kreuter J., Speiser P.P, Boye T., Gurny R., Kubis A., Enhancement of the myotic response of rabbits with pilocarpine-loaded polybutyl-cyanoaccrylate nanoparticles, Int. J. Pharm., 33, 187-193 (1986)

Harries M., Ellis P., Harper P., Nanoparticle albumin-bound paclitaxel for mestastatic breast cancer, J. Clin. Oncol., 23, 7768-7771 (2005)

Henry-Micheland M.J., Alonso M.J., Andremont A., Sauzieres J., Couvreur P., Attachment of Antibiotics to Nanoparticles: Preparation, Drug-Release and Antimicrobial Activity In Vitro, Int. J. Pharm., 35, 121-127 (1987)

Hervella P., Lozano V., Garcia-Fuentes M., Alonso M., Nanomedicine: New challenges and opportunities in cancer therapy, J. Biomed. Nanotechnol., 4, 276-292 (2008) J . Pharm. Pharmacol., 43, 548-552 (1991)

Higuchi W.I., Status of the drug deliver field from an academic pharmaceutics viewpoint, Controlled Release Newsletter, 1, 4-6 (1996)

Ho D.H., Brown N.S., Yen A., Holmes R., Keating M., Abuchowski A., Newman R.A., Krakoff I.H., Clinical pharmacology of polyethylene glycol-L-asparaginase, Drug Metab. Disposit., 14, 345-352 (1986)

Immordino M.L., Dosio F., Cattel L., Stealth liposomes: review of the basic science, rationale and clinical applications; existing and potential, Int. J. Nanomed., 1, 297-315 (2006)

Ishida M., Machida Y., Nambu N y Nagai, New mucosal dosape form of insulin, Chem. Pharm. Bull, 29, 810-816 (1981)

Janes K., Calvo P., Alonso M.J., Polyssacharide nanoparticles for protein delivery, Adv. Drug Deliv. Rev., 47, 83-97 (2001)

Kabanov A.V., Chekhonin V.P., Yu V., Alakhov V., Batrakova E.V., Lebedev A.S., Melik-Nubarov N.S., Arzhakov S.A., Levashov A.V., Morzov G.V., Severn E.S., Kabanov V.A., The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles, FEBS Lett., 258, 343-345 (1989)

Kataoka K., Harada A., Nagasaki Y., Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance, Adv. Drug Deliv. Rev., 47, 113-131 (2001)

Katre N.V., Knauf M.J., Laird W.J., Chemical modification of recombinant interleukin 2 by polyethylene glycol increases its potency in the murine Meth A sarcoma model, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84, 1487-1491 (1987)Duncan R., Kopecek J., Rejmanova P., Lloyd J.B., Targeting of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers to liver by incorporation of galactose residues, Biochim. Biophys. Acta, 755. 518-521 (1983)

Kim D.W., Kim S.Y., Kim S.W., Kim J.S., Park K., Lee M.Y., Heo D.S., Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a novel cremophor-free, polymeric micelle of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer, Ann. Oncol., 18, 2009-14 (2007)

Kirby C., Gregoriadis G., Dehydration-rehydration vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes, Biotechnology, 2, 979-984 (1984)

Klibanov Al., Maruyama K., Beckerleg A.M., Torchilin V.P., Huang L., Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong circulation time in liposomes, FEBS Lett., 268, 235-237 (1990)

Köping-Höggard M., Sánchez A., Alonso M.J., Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery, Expert Rev. Vaccines 4, 185-196 (2005)

Kreuter, J., Nanoparticles-a historical perspective, Int. J. Pharm., 331, 1-10 (2007)

Kwon G.S., Kataoka K., Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles, Adv. Drug Deliv. Rev., 16, 295-309 (1995)

Langer R., Controlled release of a therapeutic protein, Nat. Med., 2, 742-743 (1996)

Langer R., Drug delivery and targeting, Nature, 392 (Supp), 5-10 (1998)

Langer R., Folkman J., Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules, Nature, 263, 797-800 (1976)

Langer R., Improving drug delivery, The Scientist, 18, 44-45 (2004)

Langer R., New methods of drug delivery, Science, 249, 1527-1533 (1990)

Losa C., Alonso M.J., Vila J.L., Orallo F., Martinez J. Saavedra J.A., Pastor J.C., Reduction of cardiovascular side effects associated with ocular administration of metipranolol by inclusion in polymeric nanocapsules, J. Ocular Pharmacol., 8, 191-198 (1992)

Losa C., Calvo P., Castro E., Vila-Jato J.L., Alonso M.J. Improvement of ocular penetration of amikacin sulphate by association to poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles,

Lozano M.V., Torrecilla D., Torres D., Vidal A., Domínguez F., Alonso M.J., Highly Efficient System To Deliver Taxanes into Tumor Cells: Docetaxel-Loaded Chitosan Oligomer Colloidal Carriers, Biomacromolecules, 9, 2186-2193 (2008)

Maincent P., Le Verge R., Sado P.A., Couvreur P., Devissaguet J.P., Disposition kinetics and oral bioavailability of vincamine-loaded polyalkylcyanoacrylate nanoparticles, J. Pharm. Sci., 75, 955-958 (1986)

Martin F.J., Hubbell W.L., Papahadjopoulos D., Immunospecific targeting of liposomes to cells: a novel and efficient method for covalent attachment of Fab' fragments via disulfide bonds, Biochemistry, 20, 4229-4238 (1981)

Marty J.J., Oppenheim R.C., Colloidal systems for drug delivery, Aust. J. Pharm. Sci., 6, 65-76 (1977)

Marty J.J., Oppenheim R.C., Speiser P., Nanoparticles-a new colloidal drug delivery system, Pharm. Acta Helv., 53, 17-23 (1978)

Mastrobattista E., Koning G.A., Storm G., Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs, Adv. Drug Deliv. Rev., 40, 103-127 (1999)

Mathiowitz, E., Chickering, D., Jacob, J. S., Santos, C., Mathiowitz, E., Eds., Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, Vol. 1, John Willey & Sons, New York, 9- 44 (1999)

Matsumura Y., Hamaguchi T., Ura T., Muro K., Yamada Y., Shimada Y., Shirao K., Okusaka T., Ueno H., Ikeda M., Watanabe N., Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle- encapsulated doxorubicin, Brit. J. Cancer, 91, 1775-1781 (2004)

Mita A., Olszanski A.J., Walovitch R.C., Perez R.P., MacKay K., Tuck D., Simmons C., Hammond S., Mita M.M., Beeram M., Stone A.J., Rowinsky E., Lewis L.D., A Novel Microparticle Hydrophobic Drug Delivery System for Paclitaxel Clin., Cancer Res., 13, 3293 (2007).

Moser C., Metcalfe I.C., Viret J.F., Virosomal adjuvanted antigen delivery systems, Expert Rev. Vaccines, 2(2), 189-196, (2003)

Paolicelli P., De la Fuente M., Sánchez A., Seijo B., Alonso M.J., Chitosan nanoparticles for drug delivery to the eye, Expert Opin. Drug Deliv., 6, (3), 239-253 (2009)

Pérez C., Sánchez A., Putnam D., Ting D., Langer R., Alonso M.J., Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA, J. Control. Rel., 75, 211-224 (2001)

Perrie Y., Gregory Gregoriadis, Introducing liposomes to drug delivery, J. Drug Targ., 16, 518-519 (2008)

Prego C., Paolicelli P., Díaz B., Vicente S., Sánchez A., González-Fernández A., Alonso M.J., Chitosan-based Nanoparticles for Improving Immunization against Hepatitis B Infection, Vaccine, 28, 2607–2614 (2010)

Prego C., Torres D., Alonso M.J., The potential of chitosan for the oral administration of peptides, Expert Opin. Drug Deliv., 2, 843-854 (2005)

Prego C., Torres D., Alonso M.J.,Chitosan nanocapsules: a new carrier for nasal peptide delivery, J. Drug Del. Sci. Tech., 16(5), 331-337 (2006).

Prego C., Torres D., Fernandez-Megia E., Novoa-Carballal R., Quiñoá E., Alonso M.J., Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery. Effect of chitosan pegylation degree, J. Control Rel., 111, 299-308 (2006)

Preis I., Langer R., A single-step immunization by sustained antigen release, J. Immuno. Meth., 28, 193-197 (1979)

Reddy L.H., Renoir J.M., Marsaud V., Lepetre-Mouelhi S., Desmaële D., Couvreur P., Anticancer efficacy of squalenoyl gemcitabine nanomedicine on 60 human tumor cell paner and on experimental tumor, Mol. Pharm., 6:1526-35 (2009)

Sánchez A., Alonso M. J., Poly (D, L-lactide-co-glycolide) micro and nanospheres as a way to prolong blood/plasma levels of subcutaneously injected cyclosporin A. Drug Deliv., 2, 21-28 (1995)

Sánchez A., Tobío M., González L., Fabra A., Alonso M.J., Biodegradable micro and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon alpha, Eur. J. Pharm. Sci., 18, 221-229 (2003)

Schultze V., D'agosto V., Wack A., Novicki D., Zorn J., Hennig R., Safety of MF59TM adjuvant, Vaccine, 26(26), 3209-3222 (2008)

Silva C.L., Recent advances in DNA vaccines for autoinmune diseases, Expert Rev. Vaccines, 8, 239-252 (2009)

Smolin G., Okumoto M., Feiler S., Condon, D., Idoxuridine-liposome therapy for herpes simplex keratitis, Am. J. Opthalmology, 91, 220-225 (1981)

Szoka F., Papahadjopoulos D., Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes), Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 467-508 (1980)

Teijeiro-Osorio D., Remuñán-López C., Alonso M.J., New Generation of Hybrid Poly/Oligosaccharide Nanoparticles as Carriers for the Nasal Delivery of Macromolecules, Biomacromolecules, 10(2), 243-249 (2009)

Tobío M., Gref R., Sánchez A., Langer R., Alonso M.J., Stealth PLA-PEG nanoparticles as nasal protein delivery systems, Pharm. Res., 15, 270-275 (1998)
Tobío M., Gref R., Sánchez A., Langer R., Alonso M.J., Stealth PLA-PEG nanoparticles as nasal protein delivery systems, Pharm. Res., 15, 270-275 (1998)
Torchilin V.P., Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, Nat. Rev. Drug Discovery, 4, 145-160 (2005)

Torchilín V.P., Khaw B.A., Smirnov V.N., Haber E., Preservation of antimyosin antibody activity after covalent coupling to liposomes, Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 4, 1114-1119 (1979)

Torchilin V.P., Khaw B.A., Smirnov V.N., Haber E., Preservation of antimyosin antibody activity after covalent coupling to liposomes, Biochem. Biophys. Res. Commun., 89, 1114-1119 (1979)

Tuzar Z., Kratochvil P., Block and gratt copolymer micelles in solution, Adv. Colloid Interface Sci., 6, 201-232 (1966)

Tuzar, Z., Kratochvil P., Block and graft copolymer micelles in solution, Adv. Colloid Interface Sci., 6, 201-232 (1976)

Veronese, F. M., Harris J. M., Introduction and overview of peptide and protein pegylation, Adv. Drug Del. Rev., 54 (4), 453–456 (2002)

Vila A., Gill H., McCallion O., Alonso, M.J., Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density, J. Control. Rel., 98, 231-244 (2004)

Vila A., Sánchez A., Janes K. A., Behrens I., Kissel T., Vila Jato J. L. y Alonso M. J., Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery, Eur. J. Pharm. Biopharm. 57, 123-132 (2004)

Wagner V, Dullaart A., Bock A.K., Zweck A., The emerging nanomedicine landscape, Nature Biotechnology, 24, 1211-1217 (2006)

Whitehead K.A., Langer R., Anderson D.G., Knocking down barriers: advances in siRNA delivery, Nat. Rev. Drug Discov., 8(2), 129-38 (2009)

Wood R.W., Lee V.H., Kreuter J., Robinson J.R., Ocular disposition of poly-hexyl-2-cyanoacrylate nanoparticles in the albino rabbit, Int. J. Pharm. 23, 175-183 (1985)

Youssef M., Fattal E., Alonso M.J., Roblot-Treupel L., Sauzires J., Tancrede C., Omns A., Couvreur P., Andremont A., Effecctiveness of Nanoparticle-Bound Ampicillin in Treatment of Listeria monocitogenes Infection in Athymic Nude Mice, Antimicrob. Agents Chemother., 32, 8, 1204-1207 (1988)