



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

**“Microsfemas de polisacáridos y lípidos para la
administración pulmonar de macromoléculas
terapéuticas”**

Dayamí Carrión Recio

Santiago de Compostela, 2006

Resumen

El objetivo global del trabajo recogido en esta memoria experimental ha sido el desarrollar, utilizando técnicas adecuadas, microsferas de polisacáridos (quitosano) y lípidos (Dynasan®) con características morfológicas y aerodinámicas adecuadas para su administración pulmonar. Además, utilizando la insulina y la albúmina de suero bovino marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA), se ha demostrado el potencial de estas microsferas como vehículos de péptidos y proteínas terapéuticas. Para la preparación de las microsferas de quitosano, se pusieron a punto técnicas de atomización y emulsificación (formación de una doble emulsión)/evaporación del disolvente y se evaluaron dos procedimientos distintos de asociación de la proteína terapéutica a las microsferas, comprobándose que la eficacia de asociación es mayor cuando la proteína terapéutica se disuelve en la solución polimérica. Para la elaboración de las microsferas lipídicas, se recurrió a la utilización de procedimientos de emulsificación (formación de una emulsión simple o doble)/evaporación del disolvente. Se observó que se puede controlar el tamaño y morfología de las microsferas modificando distintas variables de formulación y del proceso. Los estudios *in vivo* llevados a cabo con las microsferas de quitosano (determinación de los niveles séricos de glucemia y evaluación de la distribución pulmonar mediante microscopía confocal, tras la administración intratraqueal a ratas de microsferas conteniendo insulina y FITC-BSA, respectivamente) revelaron que las microsferas de quitosano producidas por emulsificación inducían una respuesta hipoglucémica más prolongada que la solución de insulina y que las partículas obtenidas por atomización, lo que se relacionó con una captura más lenta de dichas microsferas, debido a su mayor tamaño, por los macrófagos alveolares. En definitiva, el trabajo en su conjunto permite pronosticar el interés especialmente de las microsferas de quitosano, como vehículos para la administración pulmonar de péptidos y proteínas.

Abstract

The aim of the work contained in this thesis was to develop microspheres, using polysaccharides (chitosan) and lipids (Dynasan®) with morphological and aerodynamic characteristics suitable for pulmonary delivery. Furthermore, the potential of these microspheres as peptides and proteins carriers was demonstrated using insulin and fluorescein isothiocyanate labeled bovine serum albumin (FITC-BSA). In order to prepare the chitosan (CS) microspheres, spray-drying technique and double emulsification/evaporation method were developed and two different protein association procedures were assessed. Higher association efficiency was found when the protein was dissolved in the polymeric solution. Simple and double emulsification/evaporation methods were used to prepare lipid microspheres. Size and morphology of the microspheres were found to be controlled by modifying formulation and process variables. *In vivo* studies performed with CS microspheres (determination of serum glycemic concentrations and evaluation of lung distribution by confocal analysis following intratraqueal administration of insulin and FITC-BSA loaded microspheres, respectively to rats) revealed that the insulin loaded chitosan microspheres produced by emulsification induced a more prolonged hypoglycaemic response than insulin solution used as control and the spray-dried particles, which was attributed to their slower capture owing to their larger particle size, by alveolar macrophages. In conclusion, this work evidences the potential of chitosan microspheres as peptides and proteins lung carriers.

Agradecimientos

Cuando hace ya más de 5 años contacté con el Centro de Orientación e Información al Estudiante (COIE), agradecí infinitamente que hicieran llegar mi carta de solicitud de admisión en el programa de doctorado, al Profesor Ramón Martínez Pacheco, en ese momento Director del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, quien tuvo la amabilidad de ponerse en contacto conmigo. Afortunadamente, tuve la suerte de que la profesora Carmen Remuñán López accediera a ser la Directora de mi tesis, a quién agradezco su orientación y apoyo durante estos años, al igual que al profesor José Luis Vila Jato, co-Director de la misma. Gracias a la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) y al Vicerrectorado de Relaciones Internacionales de la Universidad de Santiago de Compostela (conjuntamente con el grupo de investigación), los cuales me concedieron becas para realizar una estancia de investigación y estudios de doctorado, respectivamente, pude contar con el soporte económico para estar aquí. Por otra parte, la realización del trabajo experimental de esta tesis fue posible gracias a la financiación aportada la Xunta de Galicia y el Gobierno de España quienes adjudicaron los proyectos PGIDT00PXI20315PR y CICYT, SAF 2002-03314, respectivamente.

Por supuesto, también quiero agradecer a los profesores del grupo de investigación: María José Alonso Fernández, Begoña Seijo Rey, Dolores Torres López y Alejandro Sánchez Barreiro por la ayuda brindada ante cualquier duda o problema.

Sin dudas, la ayuda de Miro y Merche, del Servicio de Microscopía, ha sido imprescindible para que los estudios realizados utilizando las técnicas de microscopía electrónica y confocal llegaran a buen término.

Agradezco a la profesora Rosa María Señarís Rodríguez del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y especialmente a Sulay y Ana, del mismo departamento, cuyos consejos me sirvieron de mucho en el inicio de los estudios con animales.

De igual forma, agradezco a la profesora Celina Rodicio Rodicio de la Facultad de Biología quien me dio sus consejos y orientó en la preparación del tejido para microscopía confocal.

Especial mención merece la Profesora Cristina Taboada Montero del Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia, no sólo por su ayuda

sino también por su envidiable buen ánimo y la energía positiva que desprende. Quiero agradecer también a los integrantes del mismo departamento: Isabel Míguez, Joaquín Espinosa y Rosendo Millán (Cacho), tanto por la ayuda brindada como por hacerme sentir que era bien recibida entre ellos.

Por otro lado, tengo que decir que desde el mismo inicio de mi estancia en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, recibí los consejos y la ayuda de muchos estudiantes, doctorandos y postdoctorandos, quienes me transmitieron su experiencia, gracias a lo cual me fue más fácil enfrentarme a este campo que era un nuevo mundo para mí. No obstante, a pesar de la importancia que tuvo su ayuda desde ese punto de vista, ellos significaron mucho más en el terreno personal pues su compañía, cariño y comprensión hizo menos dura la pena de estar tan lejos de mi tierra. Por tanto, a ellos va dirigido mi eterno agradecimiento: mis compañeros de la facultad, aunque la mayoría ya ha terminado: Mirta, Edison, Javiera, Ana Gómez, Lisardo, Magdalena, Rafa, Margo, Angela, Ana Portero, Pedrito, Ana Grenha, Cecilia, María Alonso, Desirée, María de la Fuente, Marcos, Noemí, Felipe y Jose Carlos; otros que estuvieron por poco tiempo: Claudia, Tatiana y Liset y los más recientes: Vický, Nela, Marcílio y Livia.

No puedo dejar de decir que afortunadamente, gracias a haber compartido con muchos de ellos, he conocido y compartido con familiares y amigos, los cuales me abrieron las puertas de su casa. Mis más sinceras gracias lleguen a Cristina, Elisa y familia; Cándido, Margo y familia, Moncho, las inseparables María, Loly y Marga, Cristina, Rafa y familia; Ana Grenha y familia y Ana Gómez y familia.

Mi especial agradecimiento es para Tatiana, Alejandro y Pichi y Gema, Tino, Gemita y Dani, quienes me acogieron en sus casas en incontables ocasiones como una más de la familia, dándome todo su cariño.

Pero, sin lugar a dudas, la llegada de Chachi, mi gran amor y compañero, hizo que en estos últimos años el recuerdo de mi querida familia y de mi lejana Cuba se hiciera menos doloroso, llenándome de cariño y alegrías día a día y sirviéndome de apoyo tanto en lo personal como en lo profesional. Por todo esto, gracias.

Dedicatoria

Evidentemente esta tesis no es sólo el fruto de estos largos años en los que he estado trabajando incansablemente para lograr este gran objetivo final. Resulta imprescindible mencionar a aquellas personas que pusieron todo su empeño en que llegara a ser alguien mejor, para que un día pudiera realizar mi sueño. Tengo que dedicar en primer lugar mi tesis a mis PADRES Gloria y Anibal, porque gracias a sus enseñanzas y exigencias aprendí a llevar dentro ese bichito que se llama “aprender” y a no conformarme con lo poco.

No obstante, de todas las personas en este mundo, a mi MAMÁ es a quién más le debo porque sin su tremendamente grande y especial ayuda no hubiera podido estar aquí hoy. Su apoyo incondicional fue decisivo para que aún estando tan lejos de mi querida familia, sintiera que era muy importante el sacrificio. Por eso esta tesis va especialmente dedicada a ella.

Por supuesto también se la dedico a cada una de mis HERMANAS: Natascha, Yamilé, Mei-ling y Myosotis, a las cuales les doy una gran alegría con la culminación de mi tesis.

No puedo dejar de dedicarla a mis ABUELOS tanto a Gloria, como a aquellos que ya no están entre nosotros: Monchín, Edunia y Recio, que desde allá arriba estoy segura de que, al igual que hicieron en vida, cuidan muy bien de mí y se alegran enormemente de mis logros.

Pienso especialmente en mis SOBRINOS Rachel y Pedrito, a los cuales tristemente sólo he podido ver en contadas ocasiones en estos últimos años pero espero que un día siendo mayores, comprendan el porqué de mi ausencia. También pienso en mis sobrinos Yania y Ugo y en mi HERMANO Marcos. Espero que todos y especialmente los más pequeños, sobretodo porque cuentan con mucho más tiempo, aprendan algo positivo de todo esto.

Por último, pero no por eso menos importante, dedico esta tesis a CHACHI que a pesar de la distancia y el tiempo estuvo siempre ahí, dándome muchas fuerzas, y una vez a mi lado, me sacó de muchos apuros con sus grandes conocimientos e inteligencia. Y como gracias a él tengo una segunda familia, la cual también ha depositado todo su cariño y confianza en mí, a ellos: Ñoña, Guille, Albertico y Elvira, también dedico esta tesis.

MARÍA DEL CARMEN REMUÑÁN LÓPEZ y JOSÉ LUIS VILA JATO
PROFESORES TITULAR Y CATEDRÁTICO, RESPECTIVAMENTE,
DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada **“Microsfemas de polisacáridos y lípidos para la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas”** ha sido elaborada bajo su dirección por la Licenciada en Farmacia **Dña Dayamí Carrión Recio** en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y, hallándose concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expido y firmo la presente certificación en Santiago de Compostela, a 15 de Marzo de 2006.

Fdo.: María del Carmen Remuñán López Fdo.: José Luis Vila Jato

Índice

Página

Introducción

1. Anatomofisiología del tracto respiratorio	3
2. Mecanismos y factores que afectan el depósito pulmonar de partículas	9
3. Administración pulmonar de medicamentos	11
4. Mecanismos de absorción pulmonar de moléculas	15
5. Dispositivos de inhalación	18
6. Caracterización de polvos para inhalación	23
7. Interés de las microsferas para la administración pulmonar de fármacos	26
8. Factores que se oponen a la administración pulmonar de medicamentos	33
9. Interés del quitosano para la preparación de microsferas destinadas a la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas	34
10. Interés de los lípidos para la preparación de microsferas destinadas a la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas	36

Parte Experimental

Antecedentes, hipótesis y objetivos	51
--	----

Parte I: Preparación y caracterización *in vitro* de microsferas destinadas a la administración pulmonar de péptidos y proteínas

Parte I.1. Producción de microsferas de quitosano mediante un procedimiento de atomización

Artículo 1: Development of chitosan microspheres for pulmonary protein delivery by a spray-drying technique	61
---	----

Parte I.2: Producción de microsferas de quitosano utilizando una técnica de doble emulsificación aceite-en-agua-en-aceite (O₁/W/O₂)/evaporación del disolvente

Artículo 2. Development of a double emulsification-solvent evaporation method to produce chitosan microspheres for lung protein delivery 89

Parte I.3: Producción de microsferas lipídicas mediante técnicas de emulsificación/evaporación del disolvente

Artículo 3. Development of lipid microspheres with aerodynamic properties suited for the pulmonary delivery of therapeutic proteins 117

Parte II: Evaluación *in vivo* de las microsferas de quitosano destinadas a la administración pulmonar de péptidos y proteínas.

Parte II.1: Estudios preliminares a la evaluación *in vivo* de las microsferas de quitosano conteniendo insulina: identificación de las condiciones óptimas para la realización de los estudios en rata 145

Parte II.2: Puesta a punto del estudio de distribución *in vivo* de las microsferas de quitosano 157

Parte II.3: Estudio *in vivo* de las microsferas de quitosano

Artículo 4. Enhancement of protein lung absorption using chitosan microspheres 173

Discusión general 201

Conclusiones 225

Bibliografía 229

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Anatomofisiología del tracto respiratorio

La función principal del sistema respiratorio es la oxigenación de la sangre y la expulsión del CO₂. Desde el punto de vista anatómico, en el sistema respiratorio se distinguen dos regiones fundamentales: *extratorácica* e *intratorácica* y dentro del tórax se distinguen la zona *traqueobronquial* y la *alveolar*. Desde el punto de vista funcional, el sistema respiratorio se divide en dos grandes secciones, la *conductora* y la *respiratoria*. La sección *conductora*, ubicada dentro y fuera de los pulmones, está constituida por cavidad nasal, cavidad oral, nasofaringe, faringe, laringe, tráquea, bronquios primarios, bronquios secundarios, bronquios terciarios, bronquiolos primarios, bronquiolos secundarios y bronquiolos terminales. Además de transportar el aire, la sección *conductora* tiene la misión de filtrarlo, humedecerlo y calentarlo antes de que llegue a la *sección respiratoria* (**Figura 1**). La *sección respiratoria*, que se ubica exclusivamente en el interior de los pulmones, está constituida por los *bronquiolos respiratorios*, *conductos alveolares*, *sacos alveolares* y *alvéolos* y realiza la función del intercambio del oxígeno del aire con el CO₂ de la sangre (Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 1997) (**Figura 2**). El área superficial total que ocupan los alvéolos en el hombre es superior a 100 m², que constituye más del 90% de la superficie total del pulmón (Yang y col., 2000).

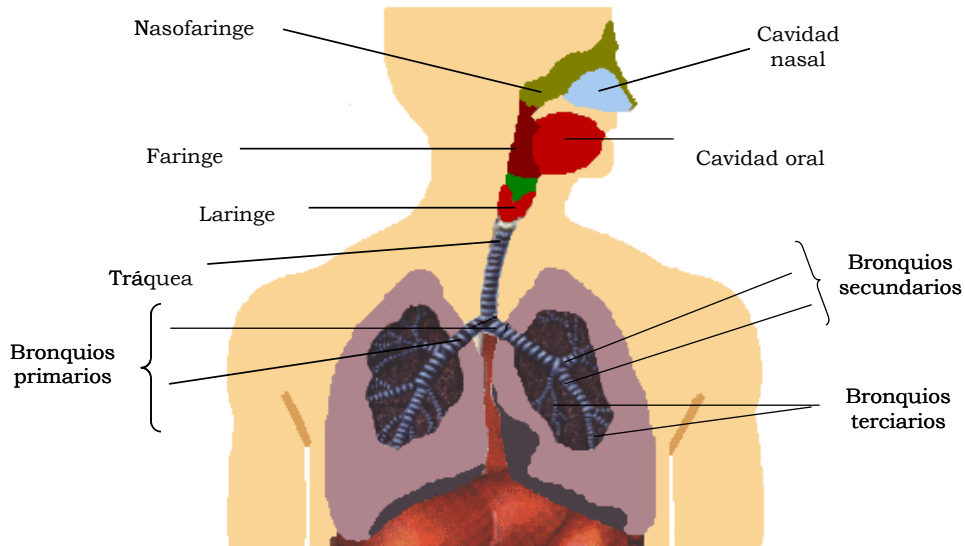


Figura 1. Dibujo de la sección conductora de los pulmones donde se aprecian las distintas partes desde la cavidad nasal hasta los bronquios terciarios.

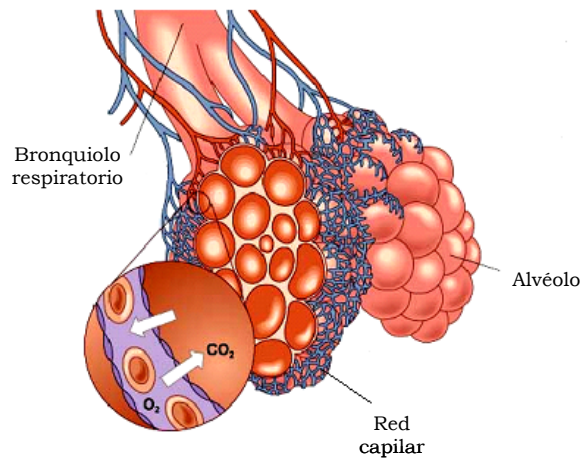


Figura 2. Dibujo de la sección respiratoria de los pulmones.

Cada ramificación del árbol traqueobronquial conduce a una nueva *generación* de las vías respiratorias. Así por ejemplo, la tráquea (*generación 0*) se subdivide en bronquios (*generación 1*) y así sucesivamente en secciones cada vez más estrechas con el objetivo de reducir la velocidad del aire para que cuando llegue a los alvéolos, se pueda producir el intercambio de gases con la sangre.

Cada *bronquiolo primario* (*generación 12*) conduce aire hacia un lóbulo pulmonar y se subdivide para formar varias ramas más pequeñas, hasta llegar a los *bronquiolos terminales* (*generación 16*) que constituyen el final de las vías conductoras del sistema respiratorio. La bifurcación de los *bronquiolos terminales* da origen a los *bronquiolos respiratorios* (*generación 17*), los cuales se diferencian de los demás bronquiolos en que sus paredes están interrumpidas a intervalos por unas dilataciones saculares de la pared llamadas *alvéolos*, donde se realiza el intercambio gaseoso y por lo que estos bronquiolos reciben su nombre. Los bronquiolos respiratorios se continúan con los *conductos alveolares* (*generación 20-22*), que no poseen paredes propias y terminan en un saco ciego de dos o más conjuntos de alvéolos o *sacos alveolares* (*generación 23*) que se abren hacia un espacio común denominado atrio (Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 1997; Taylor y Kellaway, 2001).

Los *alvéolos* constituyen la unidad estructural y funcional del sistema respiratorio ya que sus delgadas paredes permiten el intercambio de CO₂ por O₂ entre la sangre de los capilares adyacentes y el aire (Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 1997). Por su gran número, se comprimen unos a otros y eliminan al tejido intersticial entre ellos. En las áreas de contacto, los espacios alveolares se comunican unos con otros a través de los *poros alveolares de Kohn* cuya función es equilibrar la presión de aire entre los segmentos pulmonares.

La pared entre dos alvéolos adyacentes se llama *septo* o *tabique interalveolar*, la cual está integrada por una red de *capilares continuos* sostenidos por delicadas fibras colágenas y elásticas (Fawcett, 1995) en la que circula sangre proveniente de las arterias pulmonares y a la que drenan las venas pulmonares. Estos capilares constituyen la masa principal de la *pared alveolar*, ramificándose y anastomosándose para crear una red en forma de cesta en torno a cada alvéolo (Burkitt y col., 1997).

Epitelio pulmonar

El tracto respiratorio está revestido en su superficie luminal por una capa constituida por células epiteliales columnares cubiertas por cilios, entre las que se

gtintercalan otras células que se describen en la **Tabla 1**. A medida que se avanza hacia los bronquiolos, las células ciliadas se van haciendo más pequeñas y aparecen otros tipos de células como las Clara, hasta llegar a los alvéolos donde las células carecen de cilios (Smith, 1997; Taylor y Kellaway, 2001). En la **Tabla 1** se muestran las principales células que existen en el epitelio pulmonar.

Tabla 1. Células del epitelio pulmonar (Adaptada de Altieri y Thompson, 1996)

Células	Localización	Función principal
Columnares ciliadas	Desde tráquea hasta bronquiolos	Ascensor mucociliar, secreción de glicoproteínas
Goblet	Tráquea y bronquios	Secreción de mucus, progenitoras de células columnares ciliadas
Basales	Tráquea y bronquios	Progenitoras de células ciliadas Ayudan a unir las células columnares a la membrana basal
Clara	Bronquiolos	Secreción de glicoproteínas, progenitoras de células ciliadas, metabolismo de xenobióticos
Células del sistema neuroendocrino difuso	Bronquios	Quimiorreceptoras, función paracrina
Neumocitos Tipo I	Alvéolos	Intercambio gaseoso, constituyen el 97% de la superficie alveolar
Neumocitos tipo II	Alvéolos	Secreción de surfactantes, progenitoras de células Tipo I
Macrófagos alveolares	Alvéolos	Ingestión de restos endógenos y exógenos

El epitelio pulmonar tiene como principal función separar el ambiente externo del aire inspirado, del ambiente interno de las estructuras subepiteliales de las vías respiratorias. Ejerce una función protectora gracias a la presencia de las uniones especializadas “tight” entre las células epiteliales, las cuales limitan la penetración, a través de canales intercelulares, de sustancias inhaladas hacia las áreas subepiteliales. Esta protección se ve reforzada por la secreción de mucus.

El mucus, presente sólo en la región traqueobronquial (Patton y col., 1996; Taylor y Kellaway, 2001) y producido por las células epiteliales Goblet y glándulas mucosas (Patton y col., 1996), contiene una mezcla de proteínas, fundamentalmente glicoproteínas, y lípidos (Taylor y Kellaway, 2001). La capa de mucus es bifásica y consta de una “capa sol” de baja viscosidad en contacto con las células ciliadas de la superficie del epitelio y, sobre ella, una capa de mucus viscoelástico o “capa gel”. Además de proteger al epitelio de la deshidratación, el mucus ayuda a humidificar el aire inhalado. Asimismo, constituye una barrera protectora que atrapa las partículas extrañas, bacterias, virus, medicamentos, etc., que son eliminados del pulmón a través del denominado “ascensor mucociliar”. Este es uno de los mecanismos de defensa más importantes del pulmón y consiste en el atrapamiento de las partículas extrañas por la capa de mucus y transporte por los cilios de la superficie del epitelio, desde las vías aéreas inferiores hasta la tráquea y faringe, donde son tragadas o expectoradas (Altieri y Thompson, 1996).

Epitelio alveolar

El epitelio alveolar está constituido por dos tipos de células: los *neumocitos de Tipo I* y los *neumocitos de Tipo II* que ocupan el 95% y el 5%, respectivamente, de la superficie alveolar (Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt., 1997). Las células de *Tipo II*, se encuentran intercaladas entre los *neumocitos de Tipo I* y forman uniones ocluyentes con ellos. Son cuboideas y sin extensiones, a diferencia de las de *Tipo I*, las cuales son planas con finas extensiones (Smith, 1997). Secretan hacia su citoplasma gránulos densos, ovoideos y rodeados por membranas que se denominan *cuerpos laminares* debido a que su estructura interna está compuesta por laminillas agrupadas cuyo grosor es comparable al de una bicapa lipídica (Fawcett, 1995). Sintetizan, secretan y fagocitan el *agente tensoactivo pulmonar*, el cual reduce la tendencia al colapso de los alvéolos al final de la respiración y es esencial para la reparación alveolar tras los daños producidos por virus o agentes químicos. El agente tensoactivo está compuesto fundamentalmente por los fosfolípidos *dipalmitoil fosfatidilcolina* y *fosfatidilglicerol* y cuatro “*proteínas del agente tensoactivo*” A, B, C y D. El agente tensoactivo se libera por exocitosis hacia la luz alveolar y allí forma una malla conocida como *mielina tubular* (Gartner y Hiatt,

1997). Los neumocitos de *Tipo II* entran en mitosis para regenerarse a sí mismos y generar a los neumocitos de *Tipo I*. La transformación de células *Tipo II* en las *Tipo I*, conlleva la formación de monocapas con uniones íntimas que poseen una gran resistencia eléctrica transepitelial. Ambas, las células epiteliales alveolares de *Tipo I* y sus progenitoras, de *Tipo II*, constituyen barreras enzimáticas y de transporte para los sistemas de liberación de péptidos, si bien, las de *Tipo I* tienen menor actividad proteolítica que las de *Tipo II* (Yang y col., 2000).

Los *macrófagos alveolares* se originan a partir de células precursoras de la médula ósea, que son transportadas en la sangre en forma de monocitos. Éstos alcanzan el intersticio de los pulmones, se transforman en macrófagos y migran hacia la luz de los alvéolos (Fawcett, 1995; Gartner y Hiatt, 1997), donde constituyen la principal línea de defensa del pulmón. Presentan un núcleo irregular, nucléolo y filopodios prominentes y pseudópodos lameliformes en su superficie. Además, contienen gotas de lípidos y un gran número de lisosomas ricos en enzimas hidrolíticas en su citoplasma (Fawcett, 1995; Burkitt y col., 1997). Los macrófagos no forman parte de la pared alveolar, sino que migran sobre su superficie luminal y están en contacto directo con las partículas de polvo, virus, parásitos y bacterias inhaladas que escapan del atrapamiento por el mucus en las vías respiratorias (Fawcett, 1995; Ahsan y col., 2002). Los macrófagos presentan receptores en su superficie para la inmunoglobulina (IgG) y para el complemento C3b y su capacidad para fagocitar bacterias se incrementa en presencia de anticuerpos específicos. Los macrófagos superan con mucho, en número, al resto de las células del pulmón (Gartner y Hiatt, 1997; Geneser, 2003) y son continuamente eliminados y sustituidos pudiendo, además, jugar un papel muy importante en el aclaramiento de proteínas solubles e insolubles desde las vías respiratorias (Hastings y col., 1995). Tras fagocitar material exógeno, la mayoría de los macrófagos migra desde los alvéolos al interior de las vías aéreas, donde son propulsadas por los cilios hacia la faringe para ser eliminados por la tos y la deglución (Fawcett, 1995; Burkitt y col., 1997) o son transportados a través del sistema linfático hacia los nodos linfáticos y la circulación sanguínea (Taylor y Kellaway, 2001).

2. Mecanismos y factores que afectan el depósito pulmonar de partículas

Mecanismos de depósito pulmonar

Cuando las partículas de aerosol llegan al pulmón, se depositarán en el mismo, en función de su tamaño y densidad, según los siguientes mecanismos:

a) Impacto (basado en la inercia de las partículas): depende del diámetro aerodinámico (que combina el tamaño y densidad de las partículas) y de la velocidad con la que viajan con el flujo de aire en las vías respiratorias. Es especialmente significativo para partículas de diámetro aerodinámico mayor de 6 μm y ocurre en la zona extratorácica y conductos de aire donde la velocidad de flujo es alta, como en las vías respiratorias centrales de mayor diámetro de la región traqueobronquial (Ej. Tráquea y bronquios) (Schulz, 1988; Hanes y col., 2004).

b) Sedimentación (debida a fuerzas gravitacionales): Al igual que el *impacto*, depende del diámetro aerodinámico de la partícula y tiene lugar fundamentalmente en las vías aéreas de menor diámetro de la región traqueobronquial (Ej. bronquiolos primarios, secundarios y terminales) y regiones alveolares (que comprenden bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares y alvéolos), siendo insignificante para las partículas menores de 0.5 μm e importante para aquellas de tamaño 4-6 μm (Schulz, 1998; Taylor y Kellaway, 2001; Hanes y col., 2004).

c) Difusión (basada en los movimientos brownianos): Es independiente de la densidad de la partícula, está limitada fundamentalmente a partículas con diámetros aerodinámicos de 0.02-0.05 μm y ocurre en la región alveolar (Schulz, 1998; Taylor y Kellaway, 2001; Hanes y col., 2004).

El *depósito total pulmonar* hace referencia a la fracción de partículas inhaladas atrapadas en el sistema respiratorio, mientras que como *depósito regional* se conoce a la fracción de partículas depositadas en una zona específica del sistema respiratorio.

El *depósito extratorácico* ocurre en el espacio nasofaríngeo durante la inspiración por la nariz y en el espacio orolaríngeo, durante la inspiración por la boca. Ocurre para las partículas con diámetro aerodinámico mayor de 8 μm (Hanes y col., 2004) y es gobernado por el *impacto inercial*, debido a que las velocidades de flujo son elevadas y el tiempo de residencia es corto (Schulz, 1998). El depósito en esta zona aumenta a medida que lo hace el tamaño de partícula y depende del flujo de inspiración de las mismas. Al disminuir la velocidad de flujo de la inspiración, disminuye la pérdida de partículas por depósito en la zona orolaríngea, especialmente para partículas grandes.

Los mecanismos de *depósito traqueobronquial* son el *impacto inercial* y la *sedimentación gravitacional*. A medida que disminuye el diámetro de la vía y en consecuencia disminuye la velocidad de flujo, adquiere mayor importancia el mecanismo de *sedimentación*. Para partículas con diámetros aerodinámicos de 6-8 μm , tiene lugar en parte *depósito extratorácico*, mientras que para partículas de 4-6 μm , prevalece el *depósito traqueobronquial* (Hanes y col., 2004). Para velocidades de flujo de inspiración pequeños, aumenta el tiempo de residencia de las partículas en las vías aéreas y se hace más importante el mecanismo de *sedimentación* (Schulz, 1998).

Los mecanismos que rigen el *depósito alveolar* cuando las partículas son inhaladas por la boca (Hanes y col., 2004) son la *sedimentación* y la *difusión*, para partículas con diámetros aerodinámicos de 2-5 μm y de 0.02-0.05 μm , respectivamente. La inspiración forzada, que origina una alta velocidad de flujo, disminuye notablemente el depósito alveolar, por lo que el modo de inspiración tranquila es el de elección para la liberación de partículas de aerosol en esta región. Además, al incrementar el volumen de aire inspirado, aumenta el depósito en la zona alveolar y, por el contrario, disminuye en las zonas extratorácica y traqueobronquial.

Factores fisiológicos y patológicos

Las partículas inhaladas se verán obligadas a superar un camino muy tortuoso antes de llegar al sitio de deposición. En primer lugar la elevada pendiente del recodo orofaríngeo (90°) y la progresiva bifurcación y estrechamiento de las vías respiratorias, provocan grandes turbulencias en el flujo de aire inhalado, dando lugar al depósito prematuro de las partículas en zonas no deseadas del pulmón. Además, como se ha explicado en el apartado anterior, el flujo (velocidad) y volumen de aire inspirado tienen una gran influencia en la zona de deposición de las partículas inhaladas. Asimismo, la obstrucción bronquial debida a un estado de enfermedad estará asociada a flujos de aire y turbulencias superiores a los normales, lo cual causará el depósito de las partículas en las vías respiratorias de mayor diámetro de la región traqueobronquial. La broncoconstricción producida por el asma, tiene una mayor influencia en la exhalación que en la inhalación, lo cual incrementa la deposición por sedimentación.

Propiedades de las partículas (polvos para inhalación).

Entre las propiedades de las partículas que determinan su depósito en las diferentes regiones del pulmón, se encuentran: tamaño, forma, densidad y humedad. De igual forma, el propio sistema de aerosolización condicionará su depósito. Estos aspectos serán tratados con más detalle en los apartados 5 y 6.

3. Administración pulmonar de medicamentos

Administración de fármacos con efecto local

La vía pulmonar ha sido tradicionalmente utilizada para la administración de medicamentos utilizados en el tratamiento de procesos patológicos de las vías respiratorias como asma, bronquitis, enfisema pulmonar y fibrosis quística. Entre los fármacos administrados por inhalación oral podemos citar los broncodilatadores, corticoides, anticolinérgicos y antialérgicos. A éstos hay que

unir las nuevas moléculas peptídicas (**Tabla 2**) que se están introduciendo en terapéutica, algunas de las cuales se encuentran aprobadas o en diferentes fases de ensayos clínicos (Clark, 2004; Cryan, 2005).

Tabla 2. Ejemplos de proteínas y péptidos para administración pulmonar con efecto local (Clark, 2004; Cryan, 2005).

Proteína/péptido	Indicación
Proteínas surfactantes (aprobado)	Síndrome de distress respiratorio en adultos
rDNase (aprobado)	Fibrosis quística
Alfa-1-antitripsina	Enfisema
Ciclosporina A	Transplante de pulmón
Interferón γ	Cáncer
Interleukina-2	"
Inhibidor de proteinasa Alfa ₁	Deficiencia de Alfa-1-antitripsina
IL-1R	Asma
Anti-IgE Mab	"
Dipéptido Muramyl	Vacuna anti-TB
Catalasa	Estrés oxidativo
Superóxido dismutasa	"

Entre estas moléculas destaca la proteína B que es la base del surfactante pulmonar *Surfaxin*® (desarrollado por Discovery Labs), que ha pasado la fase III de ensayos clínicos y se encuentra pendiente de aprobación por la FDA. También podemos citar a la rhDNase (*Pulmozyme*® de Genentech), única enzima disponible en el mercado con efecto local, que se utiliza en el tratamiento de la fibrosis quística.

Administración de fármacos con efecto sistémico: absorción de macromoléculas

Hoy en día se asume que el pulmón constituye un lugar de absorción ideal para macromoléculas terapéuticas como péptidos y proteínas. Los rápidos avances producidos en los últimos años en el campo de la ingeniería genética y biotecnología han permitido la obtención en cantidades elevadas de una amplia gama de macromoléculas terapéuticas (proteínas, péptidos, plásmidos, DNA, oligonucleótidos) y, con ello, han dado lugar a la necesidad de diseñar nuevos sistemas así como de investigar nuevas vías para la administración eficaz de estos compuestos. El principal inconveniente que presenta la mayor parte de estas macromoléculas es que no son activas cuando se administran por vía oral, como consecuencia de la intensa degradación proteolítica que sufren en el tracto gastrointestinal y de su elevado peso molecular e hidrofilia, características que dificultan su paso a través del epitelio intestinal. En consecuencia, generalmente se administran por vía parenteral en dosis repetidas, motivo por el cual se están investigando procedimientos alternativos para su administración.

El gran interés que recientemente ha suscitado la vía pulmonar para la administración de macromoléculas terapéuticas reside en la constatación de la elevada permeabilidad del epitelio alveolar, la relativamente baja degradación enzimática con respecto a otras vías como la oral y elevadas superficie de absorción e irrigación sanguínea (Patton y col., 1992; Shen y col., 1999; Yang y col., 2000). Otra ventaja de la administración sistémica de fármacos por vía pulmonar es que se evita la metabolización hepática de primer paso del fármaco. Sin embargo, también existen algunas desventajas directamente relacionadas con los mecanismos de protección del propio organismo: a) *el recodo orofaríngeo* donde se depositan las partículas mayores de 8 μm , b) el ya mencionado *ascensor mucociliar* que expulsa hacia el exterior las partículas extrañas que hayan podido penetrar en la región traqueobronqueal (\approx 4-6 μm), c) los *macrófagos alveolares* que capturan moléculas y partículas que se depositan en la región alveolar y d) la propia eliminación con el aire espirado de las partículas que, por su pequeñísimo tamaño, no hayan podido depositarse.

En la **Tabla 3** se muestran algunas de las moléculas que están siendo evaluadas para administración sistémica pulmonar y que se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos (Clark, 2004; Cryan, 2005).

Tabla 3. Ejemplos de proteínas y péptidos que están siendo consideradas para administración pulmonar con efecto sistémico (Clark 2004; Cryan, 2005).

Proteína/péptido	Indicación
Calcitonina	Osteoporosis
Hormona paratiroide	"
Hormona de crecimiento humano	Deficiencia en el crecimiento
Interferón β	Esclerosis múltiple
Insulina	Diabetes
Análogos LH-RH	Cáncer
Ribavirin	Infecciones virales
Interferón α	"
rhG-CSF	Neutropenia
Eritropoyetina	Anemia
heparina	Anticoagulación
dDAVP (1-diaminocisteína-8-D-arginina vasopressin)	Diabetes insípida

Cabe destacar la insulina de Eli Lilly-Alkermes (*Air[®]insulin*) que se encuentra en fase III y la de Pfizer en conjunto con Nektar y Aventis (*Exubera[®]*) que recibió recientemente autorización para su comercialización en Europa por la EMEA (Agencia Europea de Medicamentos) y por la FDA (Administración Estadounidense para los alimentos y Medicamentos).

4. Mecanismos de absorción pulmonar de moléculas

Los compuestos activos pueden absorberse a nivel de las regiones traqueobronquial y alveolar del pulmón, si bien la absorción es mucho más eficaz a nivel de ésta última. Esto se debe a la ausencia de mucus y de mecanismo de aclaramiento mucociliar en esta zona, así como a su mayor área superficial e irrigación sanguínea. La molécula debe atravesar una serie de barreras entre las que se encuentran el epitelio pulmonar y el endotelio vascular, siendo el primero, el menos permeable de los dos (Patton, 1996). En la actualidad, poco se conoce acerca de los mecanismos de absorción de moléculas, si bien el paso de las macromoléculas solubles a través de estas barreras hacia la circulación sistémica parece tener lugar por transporte transcelular (*transcitosis*) y paracelular (Patton, 1996).

El transporte transcelular de moléculas tiene lugar a través de la célula. Según Kim y colaboradores (Kim y Malik, 2003a), la internalización de proteínas exógenas ocurre vía endocitosis que puede ser: pinocitosis (también llamada endocitosis en fase fluida o no específica), endocitosis adsorptiva y endocitosis mediada por receptores. En el caso de la pinocitosis (proceso en el cual ocurre la invaginación de una pequeña región de la membrana plasmática para formar vesículas intracelulares) no se produce saturación por el aumento de la concentración de proteínas exógenas y no hay competencia entre diferentes moléculas. Cuando ocurre endocitosis adsorptiva, el material exógeno se adsorbe a la membrana celular o interacciona electrostáticamente antes de la invaginación de la vesícula endocítica, siendo el área superficial de la membrana el factor limitante de la captura. Este tipo de endocitosis se satura a altas concentraciones y puede ocurrir competencia entre moléculas. Cuando la endocitosis está mediada por un receptor específico (sitio o proteína específicos), éste se une fuertemente a la proteína exógena que reconoce, teniendo lugar a continuación la invaginación de la zona donde se forma el complejo receptor-ligando y el transporte vesicular de la molécula hacia el otro lado de la membrana. A modo de ejemplo podemos citar a la transferrina radiomarcada para la cual se ha descrito la existencia del mecanismo de transcitosis (Matsukawa y col., 2000). Asimismo, se han propuesto

mecanismos de endocitosis para la hormona hGH (Folkesson 1992), pinocitosis para la enzima HRP (Matsukawa y col., 1996), transcitosis adsortiva para la ovoalbúmina (Deffebach y col., 1996) y transcitosis mediada por receptores para la inmunoglobulina G (Fandy y col., 2001; Kim y Malik, 2003a).

El transporte paracelular ocurre a través de las uniones entre células y explica la absorción de algunas moléculas. Para la inulina, la sacarosa y el fenol rojo se ha descrito que la permeabilidad o absorción a través del epitelio alveolar varía inversamente con el tamaño o peso molecular (Theodore y col., 1975, Morita y col., 1993) sugiriendo un transporte de tipo paracelular (Kobayashi y col., 1995; Hastings y col., 2004). De manera similar, en un estudio de permeabilidad de 14 proteínas y péptidos con pesos entre 1 y 150 kDa, utilizando la línea celular A549 derivada de adenocarcinoma humano, se encontró una relación inversa entre los coeficientes de permeabilidad y su peso molecular, indicando una difusión pasiva vía ruta paracelular (Kobayashi y col., 1995). Además, la permeabilidad a 4°C no era diferente de la obtenida a 37°C, lo cual reforzaba la hipótesis de la ausencia de mecanismos de transportes activos para estas macromoléculas. También se describió un transporte de tipo paracelular para la vasopresina, encefalinas y el hexapéptido SK&F110679 (Wang y col., 1993; Wall y col., 1993; Yamahara y col., 1994a; Wall y Smith, 1997).

Sin embargo, para muchas moléculas se han encontrado resultados contradictorios. Por ejemplo, se ha descrito un transporte por vía paracelular para los dextranos de tamaño 4-150 KDa (Theodore y col., 1975; Ohtani y col., 1991; Morita y col., 1993; Kobayashi y col., 1995) y transporte transcelular para aquellos mayores de 70 KDa (Matsukawa y col., 1997). Además, aunque se ha publicado que las moléculas mayores de 40 KDa atraviesan el epitelio por transcitosis (Patton 1996), en no pocos artículos se ha sugerido la ruta paracelular para numerosas moléculas en el rango de 1-500 KDa (Folkesson y col., 1990; Hastings y col., 1992; Folkesson y col., 1992; Folkesson y col., 1993; Patton y col., 1994; Kobayashi y col., 1995; Folkesson y col., 1998; Conhaim y col., 2001). Estas contradicciones evidencian la dificultad de la evaluación de los mecanismos de transporte en el pulmón de mamíferos, debido principalmente a su complejidad anatómica (Matsukawa y col., 1997) y la necesidad de la dilucidación de los mismos con una mayor profundidad.

También se han encontrado resultados diferentes entre las moléculas marcadas (para facilitar el estudio de su transporte) y sin marcar. En el caso de la insulina, hace ya dos décadas se describió (en cultivo de células alveolares tipo II de ratas) la presencia de receptores específicos para su unión (Sugahara y col., 1984), aunque no se describió la posición exacta de estos receptores, es decir si se encontraban en la región apical o basolateral de la célula (Yamahara y col., 1994b). Según el estudio realizado por Yamahara y colaboradores (Yamahara y col., 1994b), existe un flujo saturable a niveles nanomolares de [¹²⁵I]-insulina desde la región apical a la basolateral que no parece estar mediado por receptores específicos. Por el contrario, a concentraciones micromolares de insulina parece existir el mecanismo de transcitosis de fase fluida con el de difusión paracelular (Yamahara y col., 1994b). Otro ejemplo es la albúmina, para la cual se ha descrito una transcitosis regulada por receptor (Siflinger- Birnboim y col., 1991; Matsukawa y col., 2000; Kim y col., 2003b). Sin embargo, para la ¹²⁵I-albúmina (Jonh y col., 2001) y ¹³¹I-albúmina (Hastings y col., 1994), se encontró difusión paracelular. Para la albúmina bovina fluorescente se apuntó la transcitosis adsortiva (Deffebach y col., 1996) mientras que para la FITC-albumina, Wangensteen y colaboradores (Wangensteen y col., 1996) concluyeron que la ruta transcelular no jugaba un papel importante en el movimiento de la proteína a través del epitelio alveolar.

Otros autores sugieren que la absorción de moléculas en el pulmón se comporta como si existieran poros en el epitelio y el transporte tuviera lugar a través de ellos. Así, se han descrito dos poblaciones de poros, pequeños y grandes y, en algunos casos, un tercer tipo de poros ultra-grandes. Sin embargo, Patton (Patton, 1996) considera que el transporte a través de estos supuestos poros se corresponde con transportes tanto transcelular como paracelular. De esta forma, el autor plantea que los poros pequeños pueden corresponderse con las finas aberturas que existen entre las uniones íntimas de las células o con los pasos transcelulares. Los poros grandes pueden estar presentes en las uniones entre dos o tres células o pueden representar el transporte vesicular. De igual forma, pueden corresponderse con defectos del epitelio debido a la muerte por apoptosis de una célula, que deja un poro relativamente grande, el cual es rápidamente rellenado con nuevas células. La transcitosis de partículas de más de 85-95 nm

de radio parece poco probable (Hastings y col., 2004) debido a que las vesículas endocíticas tienen radios menores de ese tamaño (25-75 nm (Steinman y col., 1983), < 90 nm (Williams, 1984) ó 35 nm (Hastings y col., 1994). Esto sugiere que estas partículas deben atravesar el epitelio alveolar por vía paracelular a través de grandes poros. Según la revisión publicada por Patton (Patton, 1996), los poros pequeños presentes en el epitelio pulmonar de diferentes especies animales poseen diámetros de entre 0.4 a 5 nm. Sin embargo, los poros grandes llegan a tener tamaños tan grandes como 26 nm (Chandra y col., 1992), 50 nm (Chandra y col., 1992), 80 nm (Conhaim y col., 1988), 98 nm (Chandra y col., 1992) y 800 nm (Conhaim y col., 1988). Se han encontrado poros grandes en el epitelio de las vías respiratorias, conductos alveolares, bronquiolos respiratorios y alvéolos (Conhaim y col., 1988, Conhaim, 1989). Conhaim y colaboradores (Conhaim y col., 2001) encontraron que el transporte de moléculas de hidroxietilalmidón de diferentes tamaños puede ajustarse a un modelo de un sistema de poros de dos tamaños de 5 y 17 nm de radio.

5. Dispositivos de inhalación

Nebulizadores

Durante décadas, los inhaladores farmacéuticos han sido utilizados para la administración de fármacos que se utilizan en el tratamiento de enfermedades respiratorias. Las primeras terapias, utilizaban vapores de plantas medicinales, bálsamos, mirra y sulfuro y en el siglo XIX, se introdujeron los *nebulizadores* (Clark, 2004). El principio de funcionamiento de los *nebulizadores* se basa en la utilización de energía de un chorro de oxígeno o de aire (*nebulizadores jet*) o de un transductor piezoeléctrico de frecuencias ultrasónicas (*nebulizadores ultrasónicos*) para generar pequeñas gotas de agua conteniendo el principio activo que se encuentra alojado en un pequeño contenedor. En general, desde la perspectiva del paciente, la terapia con los *nebulizadores* requiere mucho tiempo e implica el uso de aparatos voluminosos (no-portátiles), costosos y con posibilidad de contaminación. Además, desde el punto de vista farmacéutico estos dispositivos muestran una alta variabilidad en la liberación (Smaldone y LeSouef, 2002). Sin embargo, los *nebulizadores* son capaces de liberar altas dosis de medicamento a las vías

respiratorias y el paciente no parece necesitar un entrenamiento intensivo para poder utilizarlo de manera eficaz. Con respecto a su inconveniente tamaño, recientemente se han diseñado algunos dispositivos como el *MicroAIR*[®] (de Omron), el *Aeroneb*[®]*Go* (de Aerogen, ahora NEKTAR) y el *eFlow*[®]*rapid* (de Pari), que son de tamaño más reducido, más ligeros y perfectamente transportables (**Figura 3**). La estabilidad de proteínas y péptidos por nebulización constituye una gran limitación ya que muchas de éstas moléculas son inestables en disolución acuosa, debido a efectos térmicos y de superficie (Niven, 1993; Cipolla D., 2001). No obstante, la única proteína inhalada disponible en estos momentos en el mercado es la rDNase, *Pulmozyme*[®] (de Genentech), la cual es administrada por nebulización para el tratamiento de la fibrosis quística.

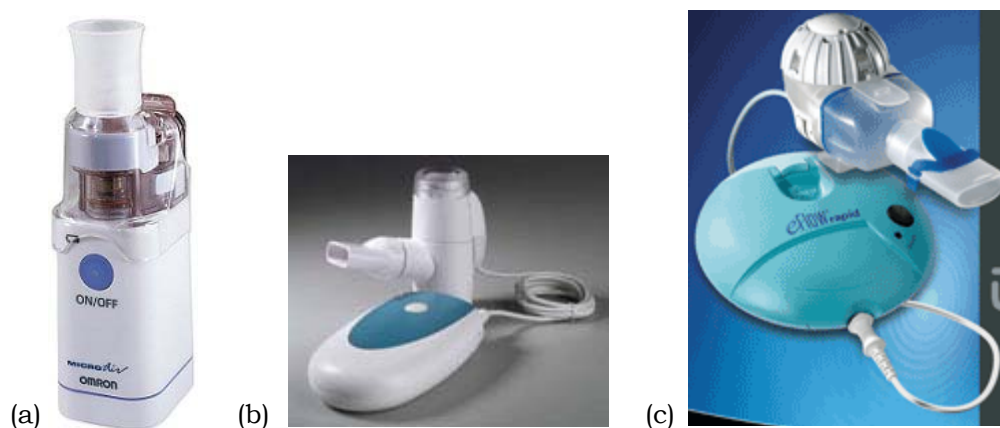


Figura 3. Ejemplos de dispositivos nebulizadores transportables: (a) *MicroAIR*[®] (de Omron), (b) *Aeroneb*[®]*Go* (de Aerogen, ahora Nektar) y (c) *eFlow*[®]*rapid* (de Pari).

Inhaladores dosificadores presurizados (pMDI)

En el año 1956 se introdujeron en el mercado los *inhaladores dosificadores presurizados (pMDI)*, convirtiéndose en el principal método utilizado para administración de fármacos destinados al tratamiento del asma en el mundo (Clark, 2004). Como bien indica su nombre, los *pMDI* son dispositivos presurizados que, al ser activados, producen la descarga de la dosis de la solución o la suspensión en un propelente. Los dispositivos *pMDI* son los prescritos comúnmente debido a su tamaño reducido (son dispositivos de bolsillo) y fácil manejo, a que las dosis suministradas son conocidas, exactas y reproducibles, a que mantienen la

esterilidad del medicamento debido a las características herméticas del sistema y a que son adaptables a circuitos de ventilación asistida. Sin embargo presentan algunas desventajas (Timsina y col., 1994; Giner y col., 2000) entre las que se encuentran la extensa deposición orofaríngea y dificultad de sincronización de la descarga del aerosol con la inspiración del paciente, aun después de un cuidadoso entrenamiento. Para solventar este problema se desarrollaron dispositivos *pMDI* activados por la respiración (Timsina M.P., 1994) como el *Autohaler*[®] de la compañía 3M, que al igual que los primeros *pMDI* utilizaba en principio clorofluorocarbono (CFC) como propelente. Sin embargo, debido a su implicación en la depleción de la capa de ozono, los CFC han sido reemplazados por los hidrofluoroalcanos (HFA). Debido a la pobre solubilidad de los surfactantes comúnmente utilizados con los CFC, en los HFA, la introducción de estos últimos ha traído consigo un intenso trabajo relacionado con la búsqueda de nuevos surfactantes, cosolventes, recubrimiento de partículas con surfactantes e ingeniería de partículas que permita la reformulación de los *pMDI* (Clark, 2004).

La corporación Aradigm desarrolló y registró el *SmartMist*[™] (**Figura 4**), que, combina un dispositivo *pMDI* ya existente con un microprocesador y un espirómetro que asegura que el paciente recibe el principio activo en el momento correcto de la inspiración. Los dispositivos *pMDI* no son, en general, el método de elección para la liberación de péptidos y proteínas debido a problemas de estabilidad al entrar en contacto con los propelentes o con la interfase aire-líquido (Banga, 1995; Cipolla y col., 2001). No obstante, algunos péptidos como el leuprolide, proteínas antigénicas, enzimas y anticuerpos han sido formulados con éxito en sistemas *pMDI* (Adjei y col., 1992; Brown y Slusser, 1994; Brown y Pickrell, 1995).



Figura 4. Dispositivo *SmartMist*[™] (de Aradigm).

Inhaladores de polvo seco (DPI)

A finales de la década de los años 50, los *inhaladores de polvo seco (DPI)* se adicionaron al arsenal de dispositivos aerosol existentes (Clark, 2004), haciéndose populares en el momento en que surgieron los problemas con los CFC (Byron, 2004). No obstante, desde su aparición han sufrido numerosos cambios evolutivos relacionados con el diseño del dispositivo y con la propia formulación del polvo seco. En cuanto a su diseño, en su desarrollo se han hecho mucho más sofisticados que aquellos iniciales de dosis única contenida en una cápsula. Entre los dispositivos monodosis comercializados se encuentran el *Spinhaler*[®] (de Aventis) y el *Rotahaler*[®] (de GlaxoSmithKline, DSK), cuya principal desventaja es el limitado número de dosis disponibles. Existen dos categorías de dispositivos multidosis “pasivos” (el paciente provee la energía para la dispersión del polvo): los que miden la cantidad de dosis que se encuentra en un reservorio y los que contienen las dosis en blisters (Byron, 2004). Entre los primeros podemos mencionar el *Turbuhaler*[®] (de Astra), *Pulvinal*[®] (de Chiesi), *Easyhaler*[®] (de Orion), *Clickhaler*[®] (de ML labs) y *Taifun*[®] (de Leiras) (Clark, 2004). Los dispositivos comercializados *Diskhaler*[®] y *Accuhaler*[®] (de GSK) se encuentran dentro de la segunda categoría. Entre las desventajas de los dispositivos “pasivos” podemos citar que precisan la inspiración voluntaria del paciente y que del esfuerzo de inspiración dependerá tanto la dosis liberada por el dispositivo como la eficacia en la desagregación de las partículas inhaladas y, en consecuencia, la dosis que llegará a las vías respiratorias. El principal desafío en el desarrollo de los DPI ha sido, por consiguiente, disminuir la dependencia de los dispositivos del flujo de inspiración de los pacientes, para lo cual se han diseñado dispositivos “activos” que disponen de una fuente de energía para dispersar el polvo. Tal es el caso de los dispositivos *Spiros*[®] (de Dura Pharmaceuticals, **Figura 5**) que utiliza un motor activado por la respiración y *Nektar* (de Nektar Therapeutic Systems, antes Inhale, **Figura 5**) que utiliza una bomba de aire mecánica en miniatura para comprimir y luego liberar el aire a través del polvo contenido en un blister. Los *DPI* se encuentran entre los métodos más populares para la liberación de proteínas en el pulmón y, por razones de estabilidad, en este caso los más adecuados son los dispositivos de dosis única (Cryan, 2005). *Exubera*[®], la insulina inhalable en forma de polvo seco de

Pfizer en conjunto con Nektar y Aventis, ha sido recientemente aprobada para su comercialización por la FDA y la EMEA. Otra formulación de insulina que está ahora en fase III es la *Air[®]insulin* de Eli Lilly-Alkermes. Asimismo, la hormona de crecimiento *Air[®]hGH* (de Eli Lilly-Alkermes) se encuentra en fase I. El dispositivo *Air[®]* de la compañía Eli-Lilly se muestra en la **Figura 5**.



Figura 5. Ejemplos de dispositivos de polvo seco: (a) *Spiros[®]* (de Dura Pharmaceuticals), (b) Inhalador pulmonar de Nektar, con Insulina = *Exubera[®]*, (c) *Air[®]* (Eli Lilly).

Inhaladores de disoluciones

No fue hasta principios de la década del 90 que los inhaladores de disoluciones (“soft mist inhalers”, *SMI*) fueron concebidos como una extensión de la técnica de nebulización (Clark, 2004). Los SMI liberan la dosis en forma de disolución y son “activos” ya que incluyen una fuente de energía, que puede ser mecánica o electromecánica, para permitir la independencia de la inspiración del paciente (Byron, 2004). Así, el dispositivo *Respimat[®]*, conteniendo una combinación de fenoterol e ipratropium, ha sido lanzado por Boehringer Ingelheim (**Figura 6**). Los dispositivos *AERx[®]* y *AeroDose[®]* han sido desarrollados por la corporación Aradigm y la compañía Aerogen (ahora NEKTAR), respectivamente (**Figura 6**) y se encuentran, los que contienen insulina, en fase III de ensayos clínicos.

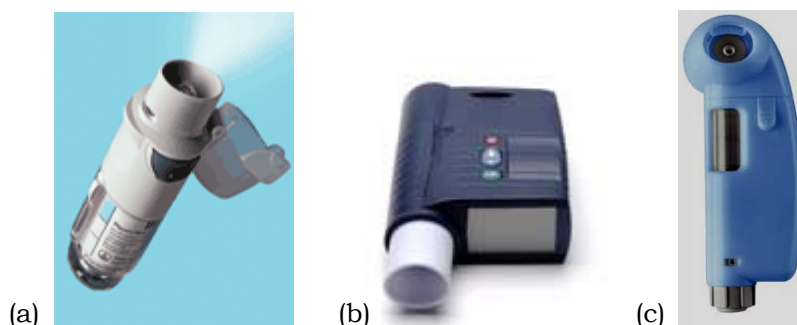


Figura 6. Ejemplos de inhaladores de disoluciones (a) *Respimat*[®] (de Boehringer Ingelheim), b) *AERx*[®] (de ARADIGM), (c) *AeroDose*[®] (de Aerogen, ahora NEKTAR).

6. Caracterización de polvos para inhalación.

La eficacia terapéutica de los fármacos inhalados está gobernada por las características del aerosol (que es una combinación de la formulación y del dispositivo) y por la variabilidad entre pacientes. Entre los factores tecnológicos que condicionan el depósito de los fármacos inhalados y que dependen de la propia formulación se encuentran: naturaleza del material, distribución de tamaños, densidad y morfología de las partículas y contenido de humedad. Todas estas propiedades afectan a las fuerzas de cohesión interparticulares y/o las fuerzas de adhesión entre las partículas y las superficies. Cuando se incrementa la cohesión entre partículas, se reduce la segregación de los polvos por los dispositivos de inhalación, resultando en agregados de partículas que no llegan a las partes más profundas del pulmón. De igual forma, al aumentar la adhesión de las partículas a las superficies, disminuye el flujo del polvo y aumenta la retención del polvo en todas las superficies de contacto. Disminuyendo la densidad de las partículas e incrementando el tamaño de las mismas, se puede mejorar el comportamiento de las partículas de aerosol debido a que partículas grandes y porosas tienen menos tendencia a aglomerarse que las partículas convencionales pequeñas y no porosas (French y col., 1996; Li y col, 1996).

Diámetro aerodinámico.

El diámetro aerodinámico de una partícula puede definirse como (Edwards D. A. 1997; Maa Y.F., 1999):

$$D_{aer} = D * \rho^{0.5} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde: D_{aer} = diámetro aerodinámico de la partícula; D = diámetro físico; ρ = densidad

El significado del tamaño de partícula aerodinámico radica en combinar la influencia del tamaño físico de las partículas y la inercia. Para partículas de igual tamaño físico, a menor ρ (partícula ligera), menor diámetro aerodinámico, lo que es más favorable puesto que las partículas ligeras viajan con mayor facilidad con el flujo de aire y alcanzan las zonas más profundas del pulmón para una deposición efectiva. Según la ecuación 1, una partícula con un diámetro geométrico de 1 μm y densidad igual a 1 g/cm^3 se depositará en el tracto respiratorio de la misma forma que una partícula de 10 μm con una densidad de 0.01 g/cm^3 . Por lo tanto, es posible variar el tamaño aerodinámico de una partícula, disminuyendo su densidad, por ejemplo, haciéndolas porosas ó huecas, lo cual puede conseguirse utilizando técnicas de microencapsulación como atomización/secado (Maa y col., 1999) y doble emulsión/evaporación del disolvente (Edwards y col., 1997).

En general se considera fracción “respirable”, a la fracción de partículas capaz de llegar a las regiones más profundas del pulmón, es decir a la constituida por partículas que poseen un diámetro aerodinámico inferior a 5 μm . No obstante, algunos autores consideran que la máxima deposición de partículas de aerosol monodisperso en la región alveolar del pulmón humano (para el 60 % de las partículas inhaladas) ocurre para D_{aer} de aproximadamente 3 μm (Edwards y col., 1997).

Sistema Analizador de Tamaño de Partícula Aerosizer® (Amherst Process Instruments (API))

Los métodos recogidos en las farmacopeas (impactador en cascada de vidrio o de metal, impactador multi-zona en fase líquida y el analizador de tamaño de partícula “Andersen”) enfatizan en el uso de los métodos de separación inercial para la determinación de la distribución del tamaño de partícula de los inhaladores farmacéuticos (USP 24, Farmacopea española). No obstante, en 1994 las autoridades reguladoras en los Estados Unidos recomendaron la utilización de las técnicas basadas en las mediciones de tiempo de vuelo (Time of flight, TOF) para corroborar los resultados obtenidos con los métodos anteriormente mencionados (Adams y col., 1994).

El *Aerosizer®*, cuyo principio de funcionamiento se basa en la aceleración e inercia de partículas y en tiempos de vuelo (Baron y col, 1993), es un equipo que permite la determinación de la distribución de tamaños de partícula de forma rápida y simple. Así, numerosos autores han utilizado este método para la determinación de tamaño de partícula aerodinámico (Ben-Jebria y col., 1999; Bot y col., 2000) y consideran que los valores de diámetro aerodinámico obtenidos a partir del *Aerosizer®* se aproximan más a los valores teóricos que los obtenidos con el impactador de cascada (Vanbever y col., 1999).

El *Aerosizer®* consta de varias partes: *Unidad Sensora*, con un sistema sensor láser para el cálculo del tiempo de vuelo; el *Sistema de Dispersión de Polvos Secos API Aerodisperser®*; el *Sistema Controlador* y el *Sistema de Vacío*. El *Aerodisperser®* es un sistema dispersante de polvos secos controlado por un microprocesador y su empleo es especialmente importante para aquellos polvos de inhalación con alta cohesividad que tienden a formar aglomerados, pues permite desaglomerar y por ende dispersar estos polvos para una correcta medición del tamaño de partícula. El equipo dispone de un accesorio denominado *Aero-Sampler*, que permite analizar muestras provenientes de dispositivos *pMDI* y del accesorio *AeroBreather*, que puede ser programado para simular la función del pulmón humano en un amplio rango de condiciones respiratorias, de tal forma

que la medición del tamaño se realiza sobre la dosis completa. Permite calcular la fracción de dosis respirable a distintas velocidades de inhalación.

El cálculo del tiempo de vuelo se basa en la siguiente ecuación (Vanveber y col., 1999),

$$C_d \frac{\pi d^2}{4} \rho_a \frac{(V_a - V_p)^2}{2} = 1/6 \pi d^3 \rho_p \frac{dV_p}{dt}$$

Donde: C_d = Coeficiente de resistencia; ρ_a = Densidad del aire; V_a = Velocidad del aire; D = Diámetro de la partícula; ρ_p = Densidad de la partícula; V_p = Velocidad de la partícula.

El diámetro aerodinámico de una partícula condiciona su velocidad de aceleración, de manera que las partículas grandes aceleran más lentamente debido a su mayor masa y tardan más tiempo en recorrer la mencionada distancia. Se registra el tiempo de vuelo entre dos rayos láser fijos cercanos, para ser convertido a diámetro geométrico usando una curva de calibración.

La medición del tamaño de partícula aerodinámico utilizando el *Aerosizer*[®] tiene una serie de ventajas que son: alta resolución; rango de medición entre 0.2 y 700 micrómetros; que se necesita sólo una pequeña cantidad (miligramos) de muestra para realizar la medición; que no requiere preparación de la muestra y que el tiempo necesario para el análisis está entre 30 segundos y 5 minutos.

7. Interés de las microsferas para la administración pulmonar de fármacos

La mayoría de los dispositivos de inhalación incorporan el principio activo en forma micronizada solo o con diluyentes como la lactosa (en el caso de los DPI) o suspendido o disuelto en un líquido propelente mediante la adición de un cosolvente (en el caso de los *pMDI*). Sin embargo, los trabajos de investigación más recientes en este campo se centran en el diseño y formulación en sistemas de inhalación de microsferas, como sistemas alternativos que pueden ser preparados con diferentes características morfológicas (forma y porosidad) y aerodinámicas

(tamaño y densidad), mediante la modificación de las variables del proceso de producción. El desarrollo de un sistema microparticulado que garantice que toda la dosis del medicamento llegue a la zona adecuada (bronquios, bronquiolos o alvéolos pulmonares) liberando durante un tiempo controlado el fármaco, permitiría disminuir los efectos secundarios y el número de dosis a administrar, mejorando en definitiva, la eficacia del tratamiento. En la **Tabla 5** se muestran algunos ejemplos de microsferas propuestas por diversos autores que presentan características *in vitro* adecuadas (en cuanto a morfología y/o tamaños aerodinámicos) para ser administradas por vía pulmonar, tanto con fines locales como sistémicos. Ejemplos de otras microsferas para las que se han obtenido buenos resultados *in vivo*, se recogen en la **Tabla 6**. Como se desprende de la observación de los datos recogidos en ambas tablas, para obtener estas microsferas se ha utilizado una gran variedad de materiales que van desde los azúcares y polímeros hidrofílicos [almidón, lactosa, trealosa, sacarosa, albúmina, hidroxipropilcelulosa (HPC), polietilenglicol (PEG) y quitosano] e hidrofóbicos [ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico glicólico (PLGA)] hasta materiales lipídicos [behenato de glicerilo, tripalmitina, aceite de palma hidrogenado] y fosfolípidos [dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina (PC), dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG) y distearoil-fosfatidilcolina (DSPC)]. En estas tablas también se puede apreciar que se han encapsulado tanto principios activos de tipo no-proteico, como hormonas, péptidos y proteínas. Cabe destacar algunas de las formulaciones obtenidas que han sido registradas como las *AIRTM* (de Alkermes), *TechnospheresTM* (de Pharmaceutical Discovery Corporation), *PulmoSpheresTM* (de Alliance Pharmaceutical Corp.), *ProMaxx[®]* (de Epic Therapeutics) y *SoliDose[®]* (de Elan Drug Delivery). Algunas de estas micropartículas, al ser grandes, porosas y/o huecas, tienen la ventaja de presentar, tal y como señalábamos previamente, menor tendencia a la aglomeración que las pequeñas y no porosas (French y col., 1996; Li y col., 1996). Además, su baja densidad incrementa la probabilidad de llegar a las partes más profundas del pulmón y, al ser grandes, disminuyen su captura por los macrófagos alveolares (Edwards y col., 1998). Además, en general, estas tecnologías registradas utilizan excipientes aceptados como seguros y tienen la ventaja de controlar la liberación

del principio activo y/o aumentar la vectorización de los mismos (García-Contreras y col., 2003).

Tabla 5. Ejemplos de microsferas con características adecuadas para ser administradas por vía pulmonar.

Excipientes	Método de obtención	Molécula encapsulada	Referencias
Albúmina	Desnaturalización por calor	Aminofilina	Tripathi y Singh, 1992
	Emulsificación	Tetrandrina	Zeng y col., 1994
Almidón	Emulsificación/ reticulación	Salbutamol	Hamdi y col., 1999
PC ¹ o DPPC ²	Atomización de emulsión	Salbutamol	Steckel y Brandes, 2004
Behenato de glicerilo/ Tripalmitina/DPPC o aceite de palma hidrogenado/DPPC	Atomización de nanopartículas de Terbutalina dispersas en excipientes	Terbutalina	Cook y col., 2005
PLA ³	Emulsificación/ evaporación	Nedocromil sódico	El-Baseir y Kellaway, 1998
		Beclometazone	
Manitol/Trealosa/ Sacarosa o mezclas	Atomización/ atomización- congelación	rhDNase ⁵ Anti-IgE Mab ⁶	Maa y col., 1999
Lactosa/albúmina/ DPPC	Atomización	Albuterol	Vanbever y col., 1999
		Estradiol	
		Insulina	
PC	Atomización	Cromolín sódico	Dellamary y col., 2000
DSPC ⁴		Sulfato de albuterol	
DSPC		Fumarato de formoterol	
Quitosano	Atomización	Betametazona	Huang y col., 2002

¹Fosfatidilcolina; ²dipalmitoil-fosfatidilcolina; ³ácido poliláctico; ⁴distearoil-fosfatidilcolina; ⁵desoxirribonucleasa humana recombinante; ⁶anticuerpo monoclonal recombinante humano anti-IgE.

Tabla 6. Ejemplos de microsferas destinadas a la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas que han dado lugar a buenos resultados *in vivo*.

Molécula encapsulada	Características microsferas	Técnica de producción	Procedimiento de administración	Principales resultados ó comentarios	Referencia
Insulina	Microsferas AIR™ (<i>Alkermes</i>) de PLGA ¹ , grandes y porosas (d = 6.8 µm; ρ tap = 0.1 g/cm ³)	Doble emulsificación/evaporación del disolvente	Intratraqueal a ratas. Ventilador Harvard	Los niveles de glucosa producidos por las partículas grandes y porosas son bajos (≈ 30 mg/dl) y prolongados (hasta 96 h), en comparación con los producidos por las microsferas pequeñas y no porosas.	Edwards y col., 1997
	Partículas pequeñas y no porosas de PLGA (d = 4.4 µm; ρ tap = 0.8 g/cm ³)	Simple emulsificación/evaporación del disolvente			
Insulina	Partículas Technospheres™ (<i>Pharmaceutical Discovery Corporation</i>) de derivado de diketopiperazina (2-3 µm)	Auto-ensamblaje de las moléculas de diketopiperazina	Voluntarios sanos. Inhalador MedTone™	Rápida absorción y acción de insulina, T _{máx} ³ en 12-14 min, mayor biodisponibilidad que por vía subcutánea	Pfutzner y col., 2002
			Voluntarios sanos. Inhalador M®	Rápida absorción y acción de insulina, mayor efecto metabólico que por vía subcutánea.	Steiner y col., 2002
Insulina	Microsferas esféricas de manitol (< 7 µm)	Atomización	Intratraqueal a ratas. Jeringa (aire comprimido)	Mayor área bajo la curva de niveles de glucosa hasta los 240 minutos que la correspondiente a la solución control.	Okamoto y col., 2000
Insulina	Micropartículas esféricas rugosas de ácido hialurónico y HPC ² o exceso de iones Zn ²⁺ (1-4 µm)	Atomización	Intratraqueal a ratas. Dispositivo Penn Century	Aumento de MRT ⁴ , t _{1/2} ⁵ , AUC ⁶ y T _{máx} con respecto al polvo de insulina puro.	Surendrakumar y col., 2003

¹ ácido poliláctico glicólico, ² hidroxipropilcelulosa; ³ tiempo en el que se alcanza la concentración máxima; ⁴ tiempo medio de residencia; ⁵ tiempo de vida media; ⁶ área sobre la curva.

Tabla 6 (continuación). Ejemplos de microsferas destinadas a la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas que han dado lugar a buenos resultados *in vivo*.

Molécula encapsulada	Características microsferas	Técnica de producción	Procedimiento de administración	Principales resultados ó comentarios	Referencia
Insulina	Partículas grandes y porosas de DPPC ¹ y albúmina con o sin protamina/cloruro de zinc en lugar de albúmina (> 5 µm, ρ = 0.1g/cm ³)	Atomización	Administración intratraqueal a ratas de polvo seco. Ventilador Harvard	Niveles plasmáticos de insulina sostenidos y similares a los obtenidos tras su inyección subcutánea. Biodisponibilidad del 80% con respecto a inyección subcutánea.	Vanbever y col., 1999
Insulina	Partículas de fosfato cálcico y PEG ²	Precipitación controlada	Intratraqueal de suspensión de partículas a ratas. Dispositivo Penn Century	Mayor t _{1/2} ⁵ , MRT ⁶ y menor velocidad de eliminación que la disolución intratraqueal de insulina. Mayor biodisponibilidad que disolución subcutánea.	García-Contreras y col., 2003
Insulina (Complejo con ciclodextrina)	Partículas de PLGA ³ (2.5 µm)	Emulsificación-evaporación del disolvente	Intratraqueal a ratas utilizando un tubo plástico	Respuesta hipoglucémica mayor con el complejo que con otras formulaciones sin ciclodextrina.	Aguiar y col., 2004
Testosterona	Partículas porosas de PLGA y PLGA-Lys ⁴ (d = 20.4 µm y 10.1 µm; ρ tap = 0.1 g/cm ³)	Emulsificación-evaporación del disolvente	Intratraqueal a ratas. Ventilador Harvard	Mayor biodisponibilidad de partículas grandes y porosas que de las no porosas.	Edwards y col., 1997
Hormona paratiroidea	Partículas de lactosa y DPPC, pequeñas (< 5 µm), de baja densidad aparente tap (< 0.06 g/cm ³)	Atomización	Intratraqueal a ratas. Insuflador Penn-Century	Alta biodisponibilidad sistémica atribuida a la presencia de DPPC en la formulación, que aumenta la permeabilidad del epitelio alveolar y de de las vías respiratorias.	Codrons y col., 2004

¹dipalmitoil fosfatidilcolina; ²polietilenglicol; ³ácido poliláctico glicólico; ⁴ácido poliláctico glicólico- lisina; ⁵tiempo de vida media; ⁶tiempo medio de residencia.

Tabla 6 (continuación). Ejemplos de microsferas destinadas a la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas que han dado lugar a buenos resultados *in vivo*.

Molécula encapsulada	Características microsferas	Técnica de producción	Procedimiento de administración	Principales resultados ó comentarios	Referencia
rhG-CSF ¹	Partículas rugosas no-esféricas (< 4 µm)	Atomización	Intratraqueal a conejos. Jeringa	La absorción de rhG-CSF administrada como polvo seco es más rápida que por vía subcutánea.	Niven y col., 1994
hIgG ²	Microsferas PulmoSpheres™ (<i>Alliance Pharmaceutical</i>) huecas y porosas de PC ³ como principal componente (d = 7µm, ρ = 0.4 g/cm ³)	Atomización	Intratraqueal a ratas. Suspensión de micropartículas administradas utilizando jeringa	Biodisponibilidad por vía intratraqueal es mayor que por vía intravenosa y nasal. Mayor respuesta inmune asociada a unión a macrófagos alveolares mediado por receptores.	Bot y col., 2000
Calcitonina	Micropartículas de gelatina (3-70 µm)	Emulsificación/reticulación	Intratraqueal a ratas. Suspensión de micropartículas administradas utilizando jeringa	Significativamente mayor disponibilidad farmacológica de calcitonina en forma de microsferas que en forma de disolución.	Morimoto y col., 2000
Rifampicina + isoniacida	Partículas de PLA ⁴ (< 4-12 µm)	Emulsificación	Intratraqueal a ratas. Dispositivo "Nose-only"	Partículas captadas fácilmente por macrófagos alveolares <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Se dirigen a micobacterias persistentes residentes en macrófagos. Permiten reducción de dosis y frecuencia de administración, disminución de toxicidad con respecto a vías oral y vascular.	Sharma y col., 2001

¹ Factor recombinante humano estimulante de granulocitosis; ² inmunoglobulina humana; ³ fosfatidilcolina; ⁴ ácido poliláctico.

Tabla 6 (continuación). Ejemplos de microsferas destinadas a la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas que han dado lugar a buenos resultados *in vivo*.

Molécula encapsulada	Características microsferas	Técnica de producción	Procedimiento de administración	Principales resultados ó comentarios	Referencia
Leuprolida	Partículas de OEDs ¹ , esféricas (2 µm)	Atomización	Intratraqueal a ratas. Insuflador Penn-Century	Niveles de leuprolida casi en estado estacionario desde las 4h hasta las 25 horas tras la administración.	Alcock y col., 2002
Rifampicina	Partículas de PLGA ² esféricas y lisas (1.2 µm)	Emulsificación/ evaporación del disolvente	Insuflación e Insuflación + Nebulización a ratas	Reducción significativa de la cantidad de bacterias viables responsables de tuberculosis, inflamación y daño producido en el pulmón tras administración de partículas en comparación con los controles de lactosa, partículas blancas de PLGA y rifampicina.	Suárez y col., 2001a
	Partículas de PLGA (2.76 µm)	Atomización	"	"	Suarez y col., 2001b

¹ éster derivados de oligosacáridos; ²ácido poliláctico glicólico;

8. Factores que se oponen a la administración pulmonar de medicamentos

Aclaramiento mucociliar

Como se había comentado previamente, las partículas inhaladas pueden ser atrapadas por el mucus, el cual es constantemente propulsado por los cilios de las células epiteliales, desde los bronquios, hasta la traquea y garganta, donde es tragado o expectorado. A este movimiento se le denomina ascensor mucociliar y representa un eficaz mecanismo de defensa del pulmón.

Aclaración por los macrófagos alveolares

Aquellas partículas que en su recorrido hayan podido escapar al atrapamiento por el mucus, son finalmente captadas por los macrófagos alveolares. Ellos, al igual que el resto de los macrófagos del organismo, tienen la capacidad de fagocitar material tanto endógeno como exógeno. Si el objetivo de una terapia es la vacunación, modulación de la respuesta inmune o tratamiento de cáncer o parasitario, la vectorización del fármaco hacia los macrófagos alveolares es altamente deseada. Sin embargo, cuando el lugar de acción del fármaco no es el macrófago, entonces la fagocitosis puede provocar un rápido aclaramiento y degradación del fármaco, disminuyendo la eficacia terapéutica del tratamiento (Cryan, 2005). Se ha comprobado que los macrófagos alveolares fagocitan una gran variedad de macromoléculas solubles como dextranos neutros y cargados, ferritina aniónica y catiónica, albúmina, FITC-albumina, hormona de crecimiento, superóxidodismutasa, gonadotropina humana y ovalbúmina, así como partículas de carbón y oro-albúmina (Williams, 1984; Hastings y col., 1995; Welty-Wolf y col., 1997; Lombry y col., 2002; Lombry y col., 2004; Bosquillón y col., 2004). En la revisión realizada por Ahsan y colaboradores (Ahsan y col., 2002) se detallan cuales son las características fisicoquímicas que influyen sobre la captación de liposomas, micropartículas y nanopartículas por distintos macrófagos presentes en el organismo o líneas celulares. Entre ellas se citan el tamaño, las propiedades superficiales, hidrofilia/lipofilia y concentración de las partículas. Una de las estrategias empleadas para evitar o retardar la captura específica por los macrófagos

alveolares consiste en la administración de partículas grandes que protegen el fármaco de la pinocitosis y degradación fagocítica (Edwards y col., 1997). Según el estudio realizado por Makino y colaboradores (Makino y col., 2003) la máxima fagocitosis de partículas de poliestireno tenía lugar para aquellas con tamaño de 1 μm y es mínima para las de 0.2 μm y 10 μm . Por otra parte, el recubrimiento de partículas con dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) y otros fosfolípidos como dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), distearoil-fosfatidilcolina (DSPC), dipalmitoil-fosfatidilserina (DPPS) y dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE) disminuye la captación de partículas por macrófagos alveolares (Evora y col., 1998; Jones y col., 2002; Jones y col., 2002a).

9. Interés del quitosano para la preparación de microsferas destinadas a la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas

El quitosano (CS) es un polímero catiónico con una importancia creciente como transportador de proteínas debido a su biocompatibilidad, ausencia de toxicidad y biodegradabilidad (Hirano y col., 1989; Knapczyk y col., 1989; Lehr y col., 1992; Aiba, 1993; Aspden y col., 1997). Se ha demostrado que el CS en forma de disolución es capaz de promover la penetración de macromoléculas a través de diferentes mucosas (Artursson y col., 1994; Schipper y col., 1996; Aspden y col., 1997; Kotze y col., 1997; Schipper y col., 1997; Portero y col., 2002a). Así por ejemplo, el efecto promotor de la permeabilidad del CS fue recientemente demostrado en un modelo *in vitro* de epitelio bucal (cultivo de células TR146) (Portero y col., 2002a). Recientemente, nuestro grupo ha desarrollado diferentes tipos de nanopartículas de CS que han demostrado ser adecuadas tanto para mejorar el transporte de péptidos como la insulina a través de la mucosa nasal (Fernández-Urrusuno y col., 1999; Behrens y col., 2002), como para provocar la respuesta inmune al toxoide tetánico tras su administración nasal (Vila y col., 2002). Estas nanopartículas tienen la ventaja específica de ser preparadas bajo condiciones experimentales muy suaves y de presentar una gran capacidad de asociación para proteínas (Calvo y col., 1997a; Calvo y col., 1997b). Además, hemos propuesto la microencapsulación de nanopartículas de quitosano en microsferas con el objetivo de mejorar su administración por inhalación (Greña y col., 2005). Hemos observado que estas nanopartículas muestran una interacción significativa con líneas celulares intestinales humanas, como las células Caco-2 y las células

secretoras de mucus MTX-E12. Estos resultados sugieren que las partículas de CS son capturadas y transportadas por mecanismos de endocitosis (Behrens y col., 2002). Además, hemos demostrado (Remuñán-López y col., 2000) que las microsferas de CS no sólo se adhieren a la mucosa gástrica, sino que son internalizadas por el epitelio. En un estudio realizado por Teijeiro y colaboradores (Teijeiro y col., 2005) consistente en la incubación de disoluciones y nanopartículas de CS en células TR146 y Calu-3, se encontró una reducción de la citotoxicidad del CS en disolución al disminuir el grado de deacetilación del mismo, y también de las nanopartículas, en comparación con la disolución (Teijeiro y col., 2005). Asimismo, estudios de permeabilidad *in vitro* y de microscopía de fluorescencia realizados por Lim y colaboradores (Lim y col., 2001) para investigar el efecto que sobre las uniones íntimas de las células 16HBE14o (derivadas del epitelio bronquial de las vías respiratorias) tenían las micropartículas de glutamato de CS, confirmaron la capacidad de estas micropartículas de aumentar la penetración de gentamicina. Recientes estudios indicaron que las nanosferas de PLGA recubiertas con CS mejoran la liberación pulmonar de elcatonina debido a las propiedades mucoadhesivas del CS y su capacidad para abrir las uniones intercelulares íntimas del epitelio pulmonar (Yamamoto y col., 2005).

El CS se ha utilizado para preparar microsferas por distintas técnicas de microencapsulación como simple emulsificación (W/O) evaporación/extracción del disolvente (Machida y col., 1991; Akbuğa y Bergisadi, 1999; Remuñán-López y col., 2000; Tokumitsu y col., 2000; Portero y col., 2002b; Kumbar y col., 2002), gelificación iónica (Kawashima y col., 1985; Bodmeier y col., 1989) y atomización (Genta y col., 1995; Williams y col., 1998; Huang y col., 2002). Nosotros hemos preparado microsferas de CS por un procedimiento de atomización que han sido eficazmente formuladas en un dispositivo pMDI utilizando el agente propelente P134a (Williams y col., 1998). No tenemos constancia de que, hasta el momento, se hayan encapsulado péptidos o proteínas en microsferas de quitosano destinadas a la administración pulmonar.

10. Interés de los lípidos para la preparación de microsferas destinadas a la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas.

En los últimos años, se han propuesto las nanopartículas y microsferas lipídicas biocompatibles como sistemas de liberación de fármacos alternativos a los poliméricos (Morel y col., 1996; Reithmeier y col., 2001a; Erni y col., 2002) para administración por diferentes rutas como oral, tópica, oftálmica y parenteral (Müller y col., 1997; Cavalli y col., 1997; Yang y col., 1999; Kunisawa y col., 2000; Reithmeier y col., 2001a; Wissing y Muller, 2000). Entre las propiedades que hacen de estas partículas un vehículo adecuado para liberación de fármacos por estas rutas se encuentran: a) posibilidad de liberación controlada el fármaco y orientación selectiva del mismo; b) protección del ingrediente activo frente a la degradación; c) biocompatibilidad pues la matriz lipídica está compuesta de lípidos fisiológicos y bien tolerados y d) permiten la incorporación de moléculas tanto hidrofílicas como lipofílicas (Schwarz y col., 1994; Lippacher y col., 2001; Hu y col., 2002; Sanna y col., 2004). Sin embargo, para la vía pulmonar existen pocos trabajos publicados sobre estos sistemas (Muller y col., 2000). Recientemente, Sanna y colaboradores (Sanna y col., 2004) prepararon micropartículas blancas utilizando glicerol como material lipídico y demostraron que la administración intratraqueal en dosis única de estas partículas a ratas, no induce respuesta inflamatoria en las vías respiratorias. Los resultados obtenidos por Videira y colaboradores (Videira y col., 2002) sugieren que las nanopartículas sólidas lipídicas de behenato de glicerilo (marcados con ^{99m}Tc , pueden ser utilizadas en el análisis por cintigrafía del sistema linfático o para terapias crónicas del pulmón, tras su administración por vía pulmonar. A pesar de que los lípidos constituyen una alternativa a los materiales poliméricos debido en parte a su versatilidad a la hora de formar diferentes estructuras (emulsiones, nanopartículas sólidas lipídicas, micropartículas) (Reithmeier y col., 2001b) y a su posible efecto promotor de la absorción debido a su composición lipídica, hasta donde sabemos, no se ha utilizado este tipo de materiales en el campo de la microencapsulación de péptidos y proteínas para administración por vía pulmonar.

El surfactante pulmonar está constituido por un 80-90% por lípidos, de los cuales las fosfatidilcolinas constituyen el 70-80% y los fosfatidilglicerol, el 5-10%. El 60% de las fosfatidilcolinas está en forma de dipalmitoilfosfatidilcolina

(DPPC) que es, por lo tanto, el principal componente del surfactante pulmonar. Entre las diversas ventajas que ofrece la utilización de estos fosfolípidos para la preparación de micropartículas para administración por esta vía se pueden citar: la disminución de la captura por macrófagos alveolares (Evora y col., 1998) y la obtención de polvos secos con buenas propiedades de flujo (Hanes y col., 1997). Además, estudios realizados con DPPC han mostrado que éste incrementa la absorción pulmonar de péptidos como la insulina (Liu y col., 1993; Mitra y col., 2001) y hormonas como la paratiroidea (Codrons y col., 2004) y la de crecimiento (Bosquillon y col., 2004). En las **tablas 5 y 6** se muestran algunos ejemplos de partículas para la obtención de las cuales se han utilizado lípidos y fosfolípidos solos, en combinación con otros o recubriendo las partículas.

Referencias bibliográficas.

- Adams, W.P., Poochikian G., Taylor, A.S., Patel, R.M., Burke, G.P., Williams, R.L., 1994. Regulatory aspects of modifications to innovator bronchodilator metered dose inhaler and development of generic substitutes. *J. Aerosol. Med.*, 7, 119-134.
- Adjei, A., Sundberg, D., Muller, J., Chun, A., 1992. Bioavailability of leuprolide acetate following nasal and inhalation delivery to rats and healthy humans. *Pharm. Res.*, 9, 244-249.
- Aguiar, M.M.G., Rodrigues, J.M., Silva, C.A., 2004. Encapsulation of insulin-cyclodextrin complex in PLGA microspheres: a new approach for prolonged pulmonary insulin delivery. *J. Microencapsul.*, 21, 553-564.
- Ahsan, F., Rivas, I.P., Khan M.A., Torres-Suarez, A.I., 2002. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers - liposomes and microspheres - on the phagocytosis by macrophages. *J. Control. Release*, 79, 29-40.
- Aiba, S.I., 1993. Studies on chitosan: 6. relationship between N-acetyl group distribution pattern and chitinase digestibility of partially N-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 15, 241-245.
- Akbuğa, J., Bergisadi, N., 1999. Effect of formulation variables on cis-platin loaded microspheres properties. *J. Microencapsul.*, 16, 697-703.
- Alcock, R., Blair, J.A., O'Mahony D.J., Raof, A., Quirk, A.V., 2002. Modifying the release of leuprolide from spray dried OED microparticles. *J. Control Release*, 82: 429-440.
- Altieri, R.J., Thompson, D.C., 1996. Physiology and Pharmacology of the airways. En: Hickey A.J. (Ed.), *Inhalation aerosols: physical and biological basis for therapy*. Marcel Dekker, New York, pp. 85-138.
- Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S.S., Illum, L., 1994. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.*, 11, 1358-1361.
- Aspden, T.J., Mason, J.D.T., Jones, N.S., Lowe, J., Skaugrud, O., Illum, L., 1997. Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo

- mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J. Pharm. Sci.*, 86, 509-513.
- Banga, A., 1995. Therapeutic peptides and proteins: Formulation, processing and delivery. Editado por Technomic Publishing Company Inc, Lancaster, Pennsylvania.
- Baron, P.A., Mazumder, M.K., Cheng, Y.S., 1993 Direct-reading techniques using optical particle detection. En: Willeke K. y Baron P.A. (Eds.), *Aerosol measurements: principles, techniques and applications*. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 381-409.
- Behrens, I., Vila, A., Alonso, M.J., Kissel, T., 2002. Comparative uptake studies of bioadhesive and non bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle absorption and transport. *Pharm. Res.*, 19, 1185-1193.
- Ben-Jebria, A., Chen, D., Eskew, M., Vanbever, R., Langer, R., Edwards, D.A., 1999. Large porous particles for sustained protection from carbachol-induced bronchoconstriction in guinea pigs. *Pharm. Res.*, 16, 555-561.
- Bodmeier, R., Chen, H., Paeratakul, O., 1989. A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles. *Pharm. Res.*, 6, 413-417.
- Bot, A.I., Tarara, T.E., Smith, D.J., Bot, S.R., Woods, C.M., Weers, J.G., 2000. Novel lipid-based hollow-porous microparticles as a platform for immunoglobulin delivery to the respiratory tract. *Pharm. Res.*, 17, 275-283.
- Bosquillon, C., Pr eat, V., Vanbever, R., 2004. Pulmonary delivery of growth hormone using dry powders and visualization of its local fate in rats. *J. Control. Release*, 96, 233-244.
- Brown, A., Slusser, J.P., 1994. Propellant-driven aerosols of functional proteins as potential therapeutics agents in the respiratory tract. *Immunopharmacology*, 28, 241-257.
- Brown, A., Pickrell, J.A., 1995. Propellant-driven aerosols for delivery of proteins in the respiratory tract. *J. Aerosol. Med.*, 8, 43-57.
- Burkitt, H.G., Young, B., Heath, J.W., 1997. Aparato respiratorio. En: *Histolog a funcional*. Editado por Churchill Livingstone, Madrid, pp. 220-234.
- Byron, P.R., 2004. Drug delivery devices: issues in drug development. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 1, 321-328.
- Calvo, P., Remu an-L opez, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997a. Novel hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 63, 25-132.
- Calvo, P., Remu an-L opez, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997b. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.*, 14, 1431-1436.
- Cavalli, R., Caputo, O., Parlotti, M.E., Trotta, M., Scarnecchia, C., Gasco, M.R., 1997. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 148, 47-54.
- Chandra, T., Miller, I.F., Yeates, D.B., 1992. A pore transport model for pulmonary alveolar epithelium. *Ann. Biomed. Eng.*, 20, 481-494.
- Cipolla, D., Farr, S.J., Gonda, I., Otulana, B., 2001. Delivery of biologics to the lung. En: Hansel T.T., Barnes P.J. (Eds.), *New drugs for asthma, allergy and COPD*. Prog. Respir. Res. Karger, London, 31, pp. 20-23.
- Clark, A.R., 2004. Pulmonary delivery technology: recent advances and potential for the new millennium. En: Hickey A.J. (Ed.), *Pharmaceutical inhalation aerosol technology*, Marcel Dekker, New York.

Codrons, V., Vanderbist, F., Ucakar, B., Preat, V., Vanbever, R., 2004. Impact of Formulation and Methods of Pulmonary Delivery on Absorption of Parathyroid Hormone (1-34) from Rat Lungs. *J. Pharm. Sci.*, 93, 1241-1252.

Concessio, N.M., Knowles, M.R., Hickey, A.J., 1999. Pharmaceutical dry powder aerosols: Correlation of powder properties with dose delivery and implications for pharmacodynamic effect. *Pharm. Res.*, 16, 828-834.

Conhaim, R.L., Eaton, A., Staub, N.C., Heath, T.D., 1988. Equivalent pore estimate for the alveolar-airway barrier in isolated dog lung. *J. Appl. Physiol.*, 64, 1134-1142.

Conhaim, R.L., 1989. Airway level at which edema liquid enters the air space of isolated dog lungs. *J. Appl. Physiol.*, 67, 2234-2242.

Conhaim, R.L., Watson, K.W., Lai-Fook, S.J., Harms, B.A., 2001. Transport properties of alveolar epithelium measured by molecular heterostarh absorption in isolated rat lungs. *J. Appl. Physiol.*, 91, 1730-1740.

Cook, R.O., Pannu, R.K., Kellaway, I.W., 2005. Novel sustained release microspheres for pulmonary drug delivery. *J. Control. Rel.*, 104, 79-90.

Crooks, P.A., 1992. Drug targeting to the lung: chemical and biochemical considerations. En: Hickey A.J. (Ed.), *Pharmaceutical inhalation aerosol technology*. Marcel Dekker, New York, pp. 83-127.

Cryan, S.A., 2005. Carrier-based strategies for targeting protein and peptide drugs to the lungs. *AAPS Journal*, 7: E20-E41 (<http://www.aapsj.org>).

Darquenne, C., Brand, P., Heyder, J., Paiva, M., 1997. Aerosol dispersion in human lung: comparison between numerical simulations and experiments for bolus tests. *J. Appl. Physiol.*, 83, 966-974.

Deffebach, M.E., Bryan, C.J., Hoy, C.M., 1996. Protein movement across across cultured guinea pig trachea: specificity and effect of transcytosis inhibitors. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 271, L744-L752.

Dellamary, L.A., Tarara, T.E., Smith, D.J., Woelk, C.H., Adractas, A., Costello, M.L., Gill, H., Weers, J.G., 2000. Hollow porous particles in metered dose inhalers. *Pharm. Res.*, 17, 168-174.

Edwards, D.A., Hanes, J., Caponetti, G., Hikach, J., Ben-Jebria, A., Eskew, M.L., Mintzes, J., Deaver, D., Lotan, N., Langer, R., 1997. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science*, 276, 1868-1871.

Edwards, D.A., Ben-Jebria, A., Langer, R., 1998. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J. Applied. Physiol.*, 85, 379-385.

El-Basseir, M.M., Kellaway, I.W., 1998. Poly (l-lactic acid) microspheres for pulmonary drug delivery: release kinetics and aerosolization studies. *Int. J. Pharm.*, 175, 135-145.

Erni, C., Suard, C., Freitas, S., Dreher, D., Merkle, H.P., Elke, W., 2002. Evaluation of cationic solid lipid microparticles as synthetic carriers for the targeted delivery of macromolecules to phagocytic antigen-presenting cells. *Biomaterials*, 23, 4667-4676.

Evora, C., Soriano, I., Rogers, R.A., Shakesheff, K.M., Hanes, J., Langer, R., 1998. Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: The effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. *J. Control. Release*, 51, 143-152.

Fandy, T.E., Lee, V.H.L., Ann, D.K., Crandall, E.D., Kim, K.J., 2001. Mechanisms of immunoglobulin G (IgG) transport across primary cultured rat alveolar epithelial cell monolayers. *Proc. 28th Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mat. and 4th Consumer & Diversified Products Conference.*, 23-27.

- Fawcett, W. Sistema respiratorio. En: Tratado de histología, Editado por Interamericana, División de McGRAW-HILL. Madrid. 1996, 765-790.
- Fernández-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1999. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.*, 16, 1576-1581.
- Folkesson, H.G., Weström, B.R., Karlsson, B.W., 1990. Permeability of the respiratory tract to different-sized macromolecules after intratraqueal instillation in young and adult rats. *Acta Physiol. Scand.*, 139, 347-354.
- Folkesson, H.G., Weström, B.R., Dahlbäck, M., Lundin, S., Karlsson, B.W., 1992. Passage of aerosolized BSA and the nona-peptide dDAVP via the respiratory tract in young and adult rats. *Exp. Lung Res.*, 18, 595-614.
- Folkesson, H.G., Weström, B.R., Pierzynowsky, S.G., Svendsen, J., Karlsson, B.W., 1993. Respiratory tract passage of different sized-macromolecules in developing pigs. *Acta Physiol. Scand.*, 147, 173-178.
- Folkesson, H.G., Weström, B.R., Karlsson, B.W., 1998. Effect of systemic and local immunization on alveolar epithelial permeability to protein in the rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157, 324-327.
- French, D.L., Edwards, D.A., Niven, R.W., 1996. The influence of formulation on emission, deaggregation and deposition of dry powders for inhalation. *J. Aerosol Sci.*, 27, 769-783.
- García-Contreras, L., Morcol, T., Bell, S.J., Hickey, A.J., 2003. Evaluation of novel particles as pulmonary delivery systems for insulin in rats. *AAPS Pharm. Sci.*, 1-11 (<http://www.aapsj.org>).
- Gartner, L.P., Hiatt, J.L., 1997. Sistema respiratorio. En: Histología. Editado por Interamericana, División de McGRAW-HILL, Madrid, pp. 301-319.
- Geneser, F., 2000. Aparato respiratorio. En: Histología. Editado por Editorial Médica Panamericana, Madrid, pp. 535-553.
- Genta, I., Pavanetto, F., Conti, B., Giunchedi, P., Conte, U., 1995. Improvement of dexamethasone dissolution rate from spray-dried chitosan microspheres. *STP Pharma Sci.*, 5, 202-207.
- Giner, J., Basualdo, L.V., Casan, P., Hernández, C., Macián, V., 2000. Normativa sobre la utilización de fármacos inhalados. *Arch. Bronconeumol.*, 36, 34-43.
- Grenha, A., Seijo B., Remuñán-López, C., 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 25, 427-437.
- Hamdi, G., Ponchel, G., Besnard, M., Duchêne, D., 1999. Loading and in vitro release of salbutamol from degradable cross-linked starch microspheres intended for pulmonary administration. *S. T. P. Pharma Sci.*, 9, 573-577.
- Hanes, J., Evora, C.E., Ben-Jebria, A., Edwards, D.A., Langer, R. 1997. Porous dry-powder PLGA microspheres coated with lung surfactant for systemic insulin delivery via the lung. *Proc. 24th Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 57-58.
- Hanes, J., Dawson, M., Har-el, Y., Suh, J., Fiegel, J., 2004. Gene delivery to the lung. En: Hickey A.J. (Ed.), *Pharmaceutical inhalation aerosol technology*. Marcel Dekker, New York, pp. 489-539.
- Hastings, R.H., Grady, M., Sakuma, T., Mattay, M.A., 1992. Clearance of different-sized proteins from the alveolar space in humans and rabbits. *J. Appl. Physiol.*, 73, 1310-1316.

- Hastings, R.H., Wright, J.R., Albertine, K.H., Ciriales, R., Matthay, M.A., 1994. Effect of endocytosis inhibitors on alveolar clearance of albumin, immunoglobulin G, and SP-A in rabbits. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 266, L544-L552.
- Hastings, R.H., Folkesson, H.G., Petersen, V., Ciriales, R., Matthay, M.A., 1995. Cellular uptake of albumin from lungs of anesthetized rabbits. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 269, 453-462.
- Hastings, R.H., Folkesson, H.G., Matthay, M.A., 2004. Mechanisms for alveolar protein clearance in the intact lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 286, L679-689.
- Hirano, S., Tsuchida, H., Nagao, N., 1989. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials*, 10, 574-576.
- Hu, F.Q., Yuan, H., Zhang, H.H., Fang, M., 2002. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int. J. Pharm.*, 239, 121-128.
- Huang, Y.C., Yeh, M., Chiang, C.H., 2002. Formulation factors in preparing BTM-chitosan microspheres by spray-drying method. *Int. J. Pharm.*, 242, 239-242.
- John, T.A., Vogel, S.M., Minshall, R.D., Ridge, K., Tiruppathi M.A.B., 2001. Evidence for the role of alveolar epithelial gp60 in active transalveolar albumin transport in the rat lung. *J. Physiol.*, 533, 547-559.
- Jones, B.G., Dickinson, P.A., Gumbleton, M., Kellaway, I.W., 2002a. Lung surfactant phospholipids inhibit the uptake of respirable microspheres by the alveolar macrophage NR8383. *J Pharm Pharmacol.*, 54, 1065-1072.
- Jones, B.G., Dickinson, P.A., Gumbleton, M., Kellaway, I.W., 2002b. The inhibition of phagocytosis of respirable microspheres by alveolar and peritoneal macrophages. *Int J Pharm.*, 236, 65-79.
- Kawashima, Y., Handa, T., Kasai, A., Takenaka, H., Lin, S.Y., Ando, Y., 1985. Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium tripolyphosphate-chitosan. *J. Pharm. Sci.*, 74, 264-268.
- Kim, K.J., Malik, A.B., 2003a. Protein transport across the lung epithelial barrier. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 284, L247-259.
- Kim, K.J., Matsukawa, Y., Yamahara, H., Kalra, V.K., Lee, V.H.L., Crandall, E.D., 2003b. Absorption of intact albumin across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 284, L458-L465.
- Knopczyc, J., Krówczyński, L., Krzck, J., Brzeki, M., Nirnberg, E., Schenk, D., Struscyk, H., 1989. Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical applications. En: Skak-Braek B., Anthonsen T., Sandford P. (Eds.), *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. Elsevier, London, pp. 657-663.
- Kobayhashi, S., Kondo, S., Juni, K., 1995. Permeability of peptides and proteins in human cultured alveolar A549 cell monolayer. *Pharm. Res.*, 12, 1115-1119.
- Kotze, A.F., de Leeuw, B.J., Lueßen, H.L., de Boer, A.G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., 1997. Chitosan for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.*, 159, 243-253.
- Kumbar, S.G., Kulkarni, A.R., Aminabhavi, T.M., 2002. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of cross-linking agent. *J. Microencapsul.*, 19, 173-180.

- Kunisawa, J., Okudaira, A., Tsutusmi, Y., Takahashi, I., Nakanishi, T., Kiyono, H., Mayumi, T., 2000. Characterization of mucoadhesive microspheres for the induction of mucosal and systemic immune responses. *Vaccine*, 19, 589-594.
- Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Schacht, E.H., Junginger, H.E., 1992. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some natural polymers. *Int. J. Pharm.*, 78, 43-48.
- Lim, S.T., Forbes, B., Martin, G.P., Brown, M.B., 2001. In vivo and in vitro characterization of novel microparticulates based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2 (4), 1-11 (<http://www.pharmscitech.com>).
- Lippacher, A., Muller, R.H., Mader, K., 2001. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 214, 9-12.
- Liu, F.Y., Shao, Z., Kildsig, D.O., Mitra, A.K., 1993. Pulmonary delivery of free and liposomal insulin. *Pharm. Res.*, 10, 228-232.
- Li, W-I., Perzl, M., Heyder, J., Langer, R., Brain, J.D., Englmeier, K-H., Niven, R.W., Edwards, D.A., 1996. Aerodynamics and aerosol particle deaggregation phenomena in model oral-pharyngeal cavities. *J. Aerosol Sci.*, 27, 1269-1286.
- Lombry, C., Bosquillon, C., Pr eat, V., Vanbever, R., 2002. Confocal imaging of rat lungs following intratracheal delivery of dry powders or solutions of fluorescent probes. *J. Control. Release*, 83, 331-341.
- Lombry, C., Edwards, D.A., Pr eat, V., Vanbever, R., 2004. Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 286, L1002-L1008.
- Maa, Y.F., Nguyen, P.A., Sweeney, T., Shire, S.J., Hsu, C.C., 1999. Protein inhalation powders: Spray drying vs Spray freeze drying. *Pharm. Res.*, 16, 249-254.
- Machida, Y.P., Sannon, T., Nagri, T., 1991. Preparation of microspheres containing fluorouracil using the «dry-in-oil» method and its release characteristics. *STP Pharma Sci.*, 1, 363-368.
- Makino, K., Yamamoto, N., Higuchi, K., Harada, N., Ohshima, H., Terada, H., 2003. Phagocytic uptake of polystyrene microspheres by alveolar macrophages: effects of the size and surface properties of the microspheres. *Colloids Surf. B.*, 27, 33-39.
- Matsukawa, Y., Yamahara, H., Lee, V.H., Crandall, E.D., Kim, K.J., 1996. Horseradish peroxidase transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm. Res.*, 13, 1331-1335.
- Matsukawa, Y., Lee, V.H., Crandall, E.D., Kim, K.J., 1997. Size-dependent dextran transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J. Pharm. Sci.*, 86, 305-309.
- Matsukawa, Y., Yamahara, H., Yamashita, F., Lee, V.H., Crandall, E.D., Kim, K.J., 2000. Rates of protein transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J. Drug. Target.*, 7, 335-342.
- Mitra, R., Pezron, I., Li, Y., Mitra, A.K., 2001. Enhanced pulmonary delivery of insulin by lung lavage fluid and phospholipids. *Int. J. Pharm.*, 217, 25-31.
- Morel, S., Ugazio, E., Cavalli, R., Gasco, M.R., 1996. Thymopentin in solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 132, 259-261.
- Morimoto, K., Katsumata, H., Yabuta, T., Iwanaga, K., Kakemi, M., Tabata, Y., Ikada, Y., 2000. Gelatin microspheres as a pulmonary delivery system: evaluation of salmon calcitonin absorption. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52, 611-617.

- Morita, T., Yamamoto, A., Itashida, M., Sezaki, H., 1993. Effect of various absorption promoters on pulmonary absorption of drugs with different molecular weight. *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 259-262.
- Müller, R.H., Rühl, D., Runge, S., Schulze-Forster, K., Mehnert, W., 1997. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharm. Res.*, 14, 458-462.
- Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S., 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 161-177.
- Niven, R., 1993. Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosols. *Pharm. Technol.*, 17, 72-81.
- Niven, R.W., Lott, F.D., Ip, A.Y., Cribbs, J.M., 1994. Pulmonary delivery of powders and solutions containing recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) to the rabbit. *Pharm. Res.*, 11, 1101-1109.
- Ohtani, T., Murakami, M., Yamamoto, A., Takada, k., Muranishi, S., 1991. Effect of absorption enhancers on pulmonary absorption of fluorescein isothiocyanate dextrans with various molecular weights. *Int. J. Pharm.*, 77, 141-150.
- Okamoto, H., Aoki, M., Danjo, K., 2000. A novel apparatus for rat in vivo evaluation of dry powder formulations for pulmonary administration. *J. Pharm. Sci.*, 89, 1028-1035.
- Patton, J.S., Platz, R.M., 1992. Routes of delivery: Case studies. (2) Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 8, 179-196.
- Patton, J.S. Trincherro, P., Platz, R.M., 1994. Bioavailability of pulmonary delivery peptides and proteins: α -interferon, calcitonins and parathyroid hormones. *J. Control. Release*, 28, 79-85.
- Patton J.S. Mechanism of macromolecule absorption by the lungs. *Adv. Drug Del. Rev.* 1996, 19: 3-36.
- Pfützner, A., Mann, A.E., Steiner, S., 2002. Technosphere™/insulin- A new approach for effective delivery of human insulin via the pulmonary route. *Diabetes Tech. Ther.*, 4, 589-594.
- Portero, A., Remuñán-López, C., Nielsen, H.M., 2002a. The potential of chitosan in enhancing peptide absorption across the TR146 cell culture model - an in vitro model of the buccal mucosa. *Pharm. Res.*, 19, 169-174.
- Portero, A., Remuñán-López, C., Criado, M.T., Alonso, M.J., 2002b. Reacetylated chitosan microspheres for controlled delivery of anti-microbial agents to the gastric mucosa. *J. Microencapsul.*, 19, 797-809.
- Real Farmacopea Española. 2005. Preparaciones para inhalación: evaluación aerodinámica de partículas finas. Madrid. España.
- Reithmeier, H., Hermann, J., Gopferich, A., 2001a. Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin. *Int. J. Pharm.*, 218, 133-143.
- Reithmeier, H., Hermann, J., Gopferich, A., 2001b. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *J. Control. Release*, 73, 339-350.
- Remuñán-López, C., Portero, A., Lemos, M., Vila-Jato, J.L., Núñez, M.J., Riveiro, P., Alonso, M.J., 2000. Chitosan microspheres for specific delivery of amoxicillin to the gastric cavity. *STP Pharm. Sci.*, 10, 69-76.

- Sanna, V., Kirschvink, N., Gustin, P., Gavini, E., Roland, I., Delattre, L., Evrard, B., 2004. Preparation and in vivo toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 5(2), 1-7 (<http://www.aspspharmscitech.org>).
- Sharma, R., Saxena, D., Dwivedi, A.K., Misra, A., 2001. Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis. *Pharm. Res.*, 18, 1405-1410.
- Schipper, N.G.M., Vårum, K.M., Artursson, P., 1996. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm. Res.*, 13, 1686-1692.
- Schipper, N.G.M., Olsson, S., Hoogstraate, J.A., deBoer, A.G., Vårum, K.M., Artursson, P., 1997. Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res.*, 14, 923-929.
- Schulz, H., 1998. Mechanisms and factors affecting intrapulmonary particle deposition: Implications for efficient inhalation therapies. *Pharm. Sci. Tech. Today.*, 1, 336-344.
- Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J.S., Muller, R.H., 1994. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J. Control. Release*, 30, 83-96.
- Shen, Z., Zhang, Q., Wei, S., Nagai, T., 1999. Proteolytic enzymes as a limitation for pulmonary absorption of insulin: in vitro and in vivo investigations. *Int. J. Pharm.*, 192, 115-121.
- Siflinger-Birnboim, A., Schnitzer, J.E., Lum, H., Blumenstock, F.A., Shen, C.P.J., Vecchio, P.J.D., Malik, A.B., 1991. Lectin binding to gp60 decreases specific albumin binding and transport in pulmonary artery endothelial monolayers. *J. Cell. Physiol.*, 149, 575-584.
- Smaldone, G., LeSouef, P.N., 2002. Nebulization: the device and clinical considerations. En: Bisgard H., O'Callaghan C. (Eds.), *Drug delivery to the lung*. Marcel Dekker, New York, pp. 269-302.
- Smith, P.L., 1997. Peptide delivery via the pulmonary route: a valid approach for local and systemic delivery. *J. Control. Release*, 46, 99-106.
- Steckel, H., Brandes, H.G., 2004. A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery. *Int. J. Pharm.*, 278, 187-195.
- Steiner, S., Pfützner, A., Harzer, O., Heinemann, L., Rave, K., 2002. Technosphere™/insulin- Proof of concept study with a new insulin formulation for pulmonary delivery. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 110, 17-21.
- Steinman, R.M., Mellman, I.S., Muller, W.A., Cohn, Z.A., 1983. Endocytosis and recycling of plasma membrane. *J. Cell. Biol.*, 96, 1-27.
- Suárez, S., O'Hara, P., Kazantseva, M., Newcomer, C.E., Hopfer, R., McMurray, D.N., Hickey, A.J., 2001a. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: screening in an infectious disease model. *Pharm. Res.*, 18, 1315-1319.
- Suárez, S., O'Hara, P., Kazantseva, M., Newcomer, C.E., Hopfer, R., McMurray, D.N., Hickey, A.J., 2001b. Airways delivery of rifampicin microparticles for the treatment of tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 48, 431-434.
- Sugahara, K., Freidenberg, G.R., Mason, R.J., 1984. Insulin binding and effects on glucose and transepithelial transport by alveolar type II cells. *Am. J. Physiol.*, 247, C472-C477.

- Surendrakumar, K., Martyn, G.P., Hodgers, E.C.M., Jansen, M., Blair, J.A., 2003. Sustained release of insulin from sodium hyaluronate based dry powder formulations after pulmonary delivery to beagle dogs. *J. Control. Release*, 91, 385-394.
- Taylor, G., Kellaway, I., 2001. Pulmonary drug delivery. En: Hillery, A., Lloyd, A., Swarbrick. (Eds.), *Drug delivery and targeting*. Taylor and Francis, New York, pp. 269-300.
- Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C., Mørck-Nielsen, H., 2005. Comparative Studies of Chitosan Nanoparticles and Molecules in Calu-3 and TR146 Cells. 32nd Ann. Meet. Exp. Control. Rel. Soc. 378.
- Theodore, J., Robin, E.D., Gaudio, R., Acevedo, J., 1975. Transalveolar transport of large polar solutes (sucrose, inulin, and dextrans). *Am. J. Physiol.*, 229, 989-996.
- Timsina, M.P., Martin, G.P., Marriott, C., Ganderton, D., Yianneskis, M., 1994. Drug delivery to the respiratory tract using dry powder inhalers. *Int. J. Pharm.*, 101, 1-13.
- Tripathi, K.P., Singh, J., 1992. Aminophylline targeting to lung: optimization of the size and drug loading of albumin microspheres. *J. Microencapsul.*, 9, 229-235.
- Tokumitsu, H., Ichikawa, H., Saha, T.K., Fukumori, Y., Block, L.H., 2000. Design and preparation of gadolinium-loaded chitosan particles for cancer neutron capture therapy. *STP Pharma. Sci.*, 10, 39-49.
- United States Pharmacopeia. 2000. Physical test and determinations: Aerosols, metered dose inhalers and dry powder inhalers. *United States Pharmacopeia* 24, 1895-1912.
- Vanbever, R. Mintzes, J.D., Wang, J., Nice, J., Chen, D., Batycky, R., Langer, R., Edwards, D.A., 1999. Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation. *Pharm. Res.*, 16, 1735-1742.
- Videira, M., Botelho, M.F., Santos, A.C., Gouveia, L.F., de Lima, P., Almeida, A., 2002. Lymphatic uptake of pulmonary delivered radiolabelled solid nanoparticles. *J. Drug Target.*, 10, 607-613.
- Vidgren, M., Karkkainen, A., Karjalainen, P., Nuutinen, J., Paronen, P., 1988. In vitro and in vivo deposition of drug particles inhaled from pressurized aerosol and drug powder inhaler. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 14, 2649-2665.
- Vila, A., Sánchez, A., Tobío, M., Calvo, P., Alonso, M.J., 2002. Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Control. Release*, 78, 15-24.
- Wall, D.A., Pierdomenico, D., Wilson, G., 1993. An in vitro pulmonary epithelial system for evaluating peptide transport. *J. Control. Release*, 24, 227-235.
- Wall, D.A., Smith, P.L., 1997. Inhalation therapy for growth hormone deficiency. En: Adjei A.K., Gupta P.K. (Eds.), *Inhalation delivery of therapeutics peptides*. Marcel Dekker, New York, pp. 453-470.
- Wang, L.Y., Toledo-Velasquez, D., Pan, W.F., Schweger-Berry, D., Ma, J.K.H., Rojanasakul, Y., 1993. Transport and hydrolysis of enkephalins in cultured alveolar epithelial monolayers. *Pharm. Res.*, 10, 1662-1667.
- Welty-Wolf, K.E., Simonson, S.G., Huang, Yuh-Chin T., Kantrow, S.P., Carraway, M.S., Chang, Ling-Yi, Crapo, J.D., Piantadosi, C.A., 1997. Aerosolized manganese SOD decreases hyperoxic pulmonary injury in primates. II. Morphometric analysis. *J. Appl. Physiol.*, 83, 559-568.
- Williams, M.C., 1984. Endocytosis in alveolar type II cells: effect of charge and size of tracer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 6054-6058.

Williams, R.O., Barron, M.K., Alonso, M.J., Remuñán-López, C., 1998. Investigation of a pMDI system containing chitosan microspheres and P134a. *Int. J. Pharm.*, 174, 209-222.

Wissing, S.A., Muller, R.H., 2001. Solid lipid nanoparticles (SLN): a novel carrier for UV blockers. *Pharmazie*, 56, 783-786.

Yamahara, H., Morimoto, K., Lee, V.H.L., Kim, K., 1994a. Effects of protease inhibitors on vasopressin transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm. Res.*, 11, 1617-1622.

Yamahara, H., Lee, V.H.L., Kim, K., 1994b. Fate of insulin during transit across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 40, 294-298.

Yamamoto, H., Kuno, Y., Sugimoto, S., Takeuchi, H., Kawashima, Y., 2005. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J. Control. Release*, 102, 373-381.

Yang, S.C., Lu, L.F., Cai, Y., Zhu, J.B., Liang, B.W., Yang, C.Z., 1999. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J. Control. Release*, 59, 299-307.

Yang, X., Joseph, K.A., Malanga, C.J., Rojanasakul, Y., 2000. Characterization of proteolytic activities of pulmonary alveolar epithelium. *Int. J. Pharm.*, 195, 93-101.

Zeng, X.M., Martin, G.P., Marriott, C., 1994. Tetrandrine delivery to the lung: The optimization of albumin microspheres preparation by central composite design. *Int. J. Pharm.*, 109, 135-145.

Parte Experimental

Antecedentes, hipótesis y objetivos

Antecedentes

1. La vía pulmonar resulta una alternativa muy interesante para la administración sistémica de macromoléculas terapéuticas (péptidos y proteínas) debido a la elevada permeabilidad del epitelio alveolar (Patton, 1992), su relativamente baja actividad proteolítica y ausencia de efecto de primer paso hepático (Shen y col., 1999; Yang y col., 2000).
2. Desde el punto de vista de su estabilidad, es preferible formular las macromoléculas terapéuticas destinadas a inhalación pulmonar, en forma de polvos secos que en disoluciones.
3. Las microsferas presentan un notable interés como vehículos de fármacos destinados a la administración pulmonar. El desarrollo de un sistema microparticulado con características morfológicas (forma, porosidad, ...) y aerodinámicas (tamaño, densidad, ...) adecuadas, que garantice que toda la dosis de principio activo llegue a la zona apropiada y libere durante un tiempo controlado el fármaco, permitirá disminuir la dosis y los efectos secundarios y, en definitiva, aumentar la eficacia del tratamiento (Vanbever y col., 1999; Edwards y col., 1997).
4. El quitosano es un polisacárido con una importancia creciente como vehículo de macromoléculas terapéuticas a través de superficies mucosas debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, así como propiedades mucoadhesivas y efecto promotor de la absorción de macromoléculas a través de diferentes mucosas y, más específicamente, a través del epitelio pulmonar (Yamamoto y col., 2005). Esta última característica convierte al quitosano en un potencial candidato para el desarrollo de sistemas destinados a la administración pulmonar de fármacos (Bernkop-Schnürch y col., 2000; Portero y col., 2002; Yamamoto y col., 2005). Además, el quitosano es un excelente

material para la formación micropartículas (Kas y col., 1997), no habiendo sido investigado hasta el momento en cuanto a la preparación de microsferas destinadas a la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas.

5. Los lípidos constituyen una interesante alternativa a los materiales poliméricos, para la elaboración de microsferas conteniendo péptidos y proteínas debido a su biocompatibilidad y posible efecto promotor de la absorción (Müller y col., 2000; Reithmeir y col., 2001). Hasta la fecha, no se han publicado trabajos correspondientes a la elaboración de microsferas lipídicas destinadas a la administración pulmonar de péptidos y proteínas terapéuticas.

Hipótesis

1. Eligiendo técnicas de microencapsulación adecuadas y materiales hidrofílicos como el polisacárido quitosano y lipofílicos como el Dynasan®, se podrán elaborar microsferas de distinta naturaleza y con características morfológicas y aerodinámicas adecuadas para ser administradas por vía pulmonar y depositarse en la zona deseada del pulmón, donde liberarán la macromolécula terapéutica (péptido o proteína) microencapsulada.
2. Estas microsferas actuarán como vehículos idóneos de macromoléculas peptídicas y proteicas una vez se haya conseguido su asociación eficaz a las mismas.
3. El quitosano, debido a su biocompatibilidad y propiedades mucoadhesivas y promotoras de la absorción, es un polímero especialmente interesante para la elaboración de vehículos destinados a la administración pulmonar de péptidos.

Objetivos

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo global de este trabajo se ha dirigido al desarrollo de sistemas microparticulares basados en quitosano y Dynasan® destinados a la administración pulmonar de péptidos y

proteínas con fines sistémicos. Para cumplir este objetivo, nos hemos propuesto cubrir una serie de etapas que, con el propósito de facilitar el seguimiento de esta memoria, se exponen a continuación con sus correspondientes objetivos parciales.

Parte I. Producción de microsferas destinadas a la administración pulmonar de péptidos y proteínas.

Objetivos:

1. *Desarrollo de microsferas de quitosano y evaluación de su comportamiento in vitro.*

En esta primera etapa, nuestro trabajo se centró en la obtención de microsferas con características morfológicas y aerodinámicas adecuadas para depositarse a nivel alveolar. Para ello se utilizó una técnica de atomización y se evaluó la eficacia de asociación de las macromoléculas modelo insulina y albúmina de suero bovino marcada con fluoresceína (FITC-BSA) a las partículas blancas utilizando dos métodos de asociación. Los resultados correspondientes a las microsferas producidas por este método se recogen en el **Artículo 1** (*Development of chitosan microspheres for pulmonary protein delivery by a spray-drying technique*). Asimismo se desarrolló una nueva técnica de doble (O₁/W/O₂) emulsificación/evaporación del disolvente y se evaluó la influencia de diferentes variables de formulación sobre el tamaño y la morfología de las microsferas, así como el potencial de las mismas para asociar y liberar insulina y (FITC-BSA). Los resultados obtenidos se recogen en el **Artículo 2** (*Development of a double emulsification-solvent evaporation method to produce chitosan microspheres for lung protein delivery*).

2. *Producción y evaluación del comportamiento in vitro de microsferas lipídicas.*

En esta etapa nos centramos en el desarrollo de microsferas constituidas únicamente por lípidos, con características morfológicas y aerodinámicas adecuadas para administración pulmonar. Para ello se

utilizaron los lípidos Dynasan® 114, 116 y 118 y colesterol y se pusieron a punto técnicas de simple (O/W) y doble (W₁/O/W₂) emulsificación/evaporación del disolvente. Se evaluó la influencia de diferentes variables de formulación sobre el tamaño y la morfología de las microsferas, así como su potencial para asociar y liberar la proteína FITC-BSA. Los resultados obtenidos correspondientes a este objetivo se recogen en el **Artículo 3** (*Development of lipid microspheres with aerodynamic properties suited for the pulmonary delivery of therapeutic proteins*).

Parte II. Evaluación *in vivo* de las microsferas de quitosano destinadas a la administración pulmonar de péptidos y proteínas.

Objetivos:

1. *Estudio del comportamiento in vivo de las microsferas de quitosano.*

El objetivo de esta etapa consistió en la estimación de la respuesta hipoglucémica tras la administración intratraqueal a ratas normales de polvos secos constituidos por microsferas de quitosano conteniendo insulina. Más específicamente, se evaluó la influencia del tamaño de partícula, cantidad de microsferas administrada y relación quitosano/insulina sobre la disminución de niveles de glucosa.

2. *Estudio de distribución de las microsferas en pulmón por microscopía confocal de fluorescencia*

Para apoyar los resultados obtenidos tras la administración de microsferas de quitosano conteniendo insulina, se investigó de forma cualitativa la deposición en pulmones de microsferas de quitosano cargadas con FITC-BSA utilizando la técnica de microscopía confocal.

Los resultados obtenidos a partir de ambos estudios se muestran en el **Artículo 4** (*Enhancement of protein lung absorption using chitosan microspheres*).

Referencias bibliográficas

- Edwards, D.A., Hanes, J., Caponetti, G., Hikach, J., Ben-Jebria, A., Eskew, M.L., Mintzes, J., Deaver, D., Lotan, N., Langer, R., 1997. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science*, 276, 1868-1871.
- Kas, H.S., 1997. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. *J. Microencapsul.*, 14, 659-711.
- Patton, J.S., Platz, R.M., 1992. Routes of delivery: Case studies. (2) Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 8, 179-196.
- Portero, A., Remuñán-López, C., Nielsen, H.M., 2002. The Potential of Chitosan in Enhancing Peptide and Protein Absorption Across the TR146 Cell Culture Model-An in Vitro Model of the Buccal Epithelium. *Pharm. Res.*, 19, 169-174.
- Bernkop-Schnürch, A., 2000. Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems. *Int. J. Pharm.*, 194, 1-13.
- Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S., 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 161-177.
- Reithmeier, H., Herrmann, J., Göpferich, A., 2001. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *J. Control. Rel.*, 73, 339-350.
- Shen, Z., Zhang, Q., Wei, S., Nagai, T., 1999. Proteolytic enzymes as a limitation for pulmonary absorption of insulin: in vitro and in vivo investigations. *Int. J. Pharm.*, 192, 115-121.
- Vanbever, R., Ben-Jebria, A., Mintzes, J.D., Langer, R., Edwards, D.A., 1999. Sustained release of insulin from insoluble inhaled particles. *Drug Dev. Research*, 48, 178-185.
- Yang, X., Joseph, K.A., Malanga, C.J., Rojanasakul, Y., 2000. Characterization of proteolytic activities of pulmonary alveolar epithelium. *Int. J. Pharm.*, 195, 93-101.
- Yamamoto, H., Kuno, Y., Sugimoto, S., Takeuchi, H., Kawashima, Y., 2005. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J. Control. Release*, 102, 373-381.

**Parte I. Preparación y caracterización *in vitro* de
microsfemas destinadas a la administración pulmonar
de péptidos y proteínas**

***Parte I.1. Producción de microsferas de quitosano
mediante un procedimiento de atomización***

ARTÍCULO 1

Development of chitosan microspheres for pulmonary protein delivery by a spray-drying technique

D. Carrión-Recio., J.L. Vila-Jato, C. Remuñán –López*

*Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,
University of Santiago de Compostela, Campus Sur, 15782-Santiago de Compostela,
Spain.*

* Corresponding author: Tel.: 00 34 981 563100 – ext. 15045;
 Fax: 0034 981 547148
 E-mail: ffcarelo@usc.es

***Artículo previsto para ser sometido a evaluación por International Journal
of Pharmaceutics***

Abstract

Chitosan microspheres suited for pulmonary protein delivery were prepared by a spray drying technique. The microspheres were spherical and had a particle size (Feret's diameter) smaller than 2.2 μm . Their real densities ranged between 1.14 and 1.25 g/cm^3 and the apparent tap densities were as low as 0.21-0.31 g/cm^3 . Aerodynamic diameters obtained using a TSI Aerosizer[®] LD were smaller than 5 μm , thus demonstrating the adequacy of these small microspheres to be delivered to the deep lung. The suitability of these microspheres for the entrapment and controlled release of proteins was investigated using insulin and fluorescein isothiocyanate-labeled bovine serum albumin (FITC-BSA) as model compounds, and two different methods for their association. In the first method macromolecule solution was mixed with the polymer solution before the spray-drying process. In the second method the protein was adsorbed onto the blank microspheres surface. Higher proteins association efficiencies were obtained with microspheres prepared by the first method. Using the second method, a maximal association of FITC-BSA to the chitosan glutamate microspheres surface was obtained, insulin being 37-53%. In contrast, peptide association to chitosan acetate microspheres reached values up to 90%. Insulin release from chitosan was fast with 63% being released after 15 min for chitosan glutamate microspheres loaded by the first method. However, FITC-BSA loaded microspheres did not release the protein under the assayed conditions. Insulin release from surface loaded chitosan acetate microspheres increased when decreasing the insulin content.

Keywords: Chitosan, insulin, FITC-BSA, microspheres, pulmonary administration

1. Introduction

The delivery of large therapeutic molecules such as peptides and proteins to the lung by inhalation has attracted tremendous scientific and biomedical interest in the recent years. Pulmonary administration has many advantages over other delivery routes because the large alveolar surface area, low thickness epithelium, extensive vascularization, relatively low proteolytic activity compared to other administration routes and the absence of the first-pass effect (Patton and Platz, 1992; Evora et al., 1998; Clark, 2002; Courrier et al., 2002). Inhaled drugs can be absorbed after their deposition in various parts of the respiratory tract, including the upper airways, mouth, pharynx and lower airways (Washington, 1989). Nevertheless, the highest absorption occurs in the alveolar region owing to its favorable characteristics, mentioned above. Therefore, the prerequisite for the reliable and specific lung delivery of macromolecules is the design of a dry powder carrier with adequate size and density and, hence, aerodynamic diameter to deposit in the alveoli (Taylor and Kellaway, 2001). However, inhaled particles must overcome certain obstacles and lung defense mechanisms before reaching alveoli, essentially the effect of the airways structure and the mucociliary clearance (Rios et al., 1994; Gehr et al., 1996; Clark, 2002; Courrier et al., 2002). Furthermore, once they are deposited in the deep lung, they could suffer enzymatic degradation or capture by alveolar macrophages, which migrate and are cleared from the traqueobronchial region via the mucocilliar escalator, or transported via the lymphatic system to lymph nodes and bloodstream (Taylor, 2001).

Chitosan (CS) is a polysaccharide with well-documented relevant properties as biocompatibility, low toxicity and biodegradability (Hirano et al., 1988; Knapczyc, 1989; Dornish et al., 1997). Furthermore it is mucoadhesive (Lehr et al., 1992) and has the capacity of promoting macromolecules permeation through well-organized epithelia (nasal, intestinal, ocular, buccal) (Artursson et al., 1994; Aspden, 1997; Borchard et al., 1996; Schipper, 1996, 1997; Kotze, 1997; Fernández-Urrusuno, 1999; De Campos et al., 2001; Lim et al., 2001; Behrens, 2002; Portero et al., 2002a). Obtained from the deacetylation of chitin

CS is formed of D-glucosamine and N-acetilglucosamine units (Muzzarelli, 1985), whose unions can be destroyed by pulmonary lysozyme (Muzzarelli, 1997).

Over the last few years, there has been an increasing interest in the use of CS microspheres as mucoadhesive carriers, particularly for nasal and peroral delivery of peptide drugs in order to improve their absorption. Different techniques have been proposed for their preparation, such as simple emulsification (W/O)/solvent evaporation (Akbuğa, 1999; Remuñán-López et al., 2000; Tokumitsu, 2000; Kumbar, 2002; Portero et al., 2002b) and dry-in-oil (Machida, 1991) processes. Furthermore, a number of articles have been published describing the preparation of CS microspheres by spray drying methods (Genta, 1995; He et al., 1999; Williams et al., 1998; Anal et al., in press). Spray-drying is a well-known technique, which is commonly used to prepare dry powders from drug-excipient solutions and suspensions. The particle size of the microspheres obtained by this methods, range from a few microns to several tens of microns and have a relatively narrow distribution. We have recently proposed the microencapsulation of CS nanoparticles in mannitol microspheres, by a spray-drying technique, with the aim of improving their administration by aerosolization (Grenha et al., 2005). Furthermore, we had previously demonstrated that CS microspheres which were obtained by spray-drying polymer solutions or nanoparticles with no additional excipients, were compatible with the hydrofluoralkane P134a and, hence, adequate for lung delivery via pressurized dose inhalers (pMDI) (Williams et al., 1998). To our knowledge, the potential of CS as pulmonary protein carriers has not been evaluated yet, except for the CS surface-modified PLGA nanospheres containing calcitonin, with CS opening the intercellular tight junctions in the lung epithelium and improving the peptide absorption (Yamamoto y col., 2005).

In this work, we reported the preparation, using a spray-drying technique, of CS microspheres intended for deep lung protein deposition. The microspheres morphological and aerodynamic properties were characterized, and their potential as protein carriers was investigated using insulin (IN) and fluorescein isothiocyanate labeled bovine serum albumin (FITC-BSA) as model peptide and

protein, respectively. In addition, based on the previous considerations and acquired knowledge about the CS benefits, we hypothesized that CS microspheres could promote the macromolecules absorption.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The following chemicals were purchased from commercial suppliers and used as received: chitosan (CS) as a free base (Sea cure 223, molecular weight (Mw) = 150 kDa, deacetylation degree > 80%) and chitosan glutamate (Sea cure Mw = 300 kDa, deacetylation degree > 80%) (*Pronova Lab.*, Norway); insulin (IN) and fluorescein isothiocyanate labeled bovine serum albumin (FITC-BSA) (*Sigma Aldrich*, Spain). Ultrapure water (Milli-Q plus, *Millipore Ibérica*, Spain) was used throughout. All other chemicals were of the highest grade available and were used without further purification.

2.2. Preparation of drug-unloaded (blank) microspheres

CS glutamate aqueous solution (2% w/w) was prepared by dissolving CS glutamate in distilled water under magnetic stirring at room temperature overnight, and diluted with water or NaOH 0.01N to obtain a polymer solution (1% w/w). CS acetate solution (3% w/w) was prepared by dissolving CS base in acetic acid 1.5N under magnetic stirring at room temperature overnight. Then, this solution was centrifuged (15000 rpm, 15 min, 15°C) to eliminate eventual impurities and diluted with water to reach a polymer (1% w/w) solution in acetic acid 0.5M.

CS microspheres were produced by spray-drying the polymer solutions (1% w/w) using a laboratory-scale spray-dryer [*Buchi® Mini Spray Dryer, model 190, Büchi AG, Labortechnik*, Switzerland] with a two-fluid nozzle (0.5). The spray-drying operating conditions were: inlet air temperature = 120-130°C, outlet air temperature = 70-90°C, drying air flow rate = 600 NL/h, liquid feed rate = 2.5

ml/min. The produced microspheres were freeze-dried (-30°, 24 hr, *Labconco apparatus, Labconco Corp.*, Kansas City, MI, USA) and stored in a dessicator containing silicagel at room temperature until use.

2.3. Determination of spray-drying process yield

The spray-drying production yields (P.Y.) were calculated as follows:

$$\text{P.Y. (\%)} = \frac{\text{Microspheres weight}}{\text{Total solids weight}} \times 100$$

2.4. Characterization of microspheres size and surface morphology

The particle size was estimated as the Feret's diameter (the measured distance between parallel lines that are tangent to the particle profile and perpendicular to the ocular scale) and was directly determined with an optical microscope (*Olympus BH-2*, Tokyo, Japan) as the mean of 100 particles.

Microspheres were placed onto metal plates, coated with gold palladium to achieve a film of 70 nm thickness (*High Resolution Sputter Coater SC7640, Thermo VG Scientific*, England) and viewed using a scanning electron microscope (*SEM, JSM-6400*, Tokyo, Japan).

2.5. Determination of microspheres density

Real densities of blank particles were determined by Helium pycnometry (*Micropycnometer, Quanta Chrome, model MPY-2*, U.S.A.) (n = 3). Apparent (tap) densities were obtained by measuring the volume of a known weight of powder in a 10 mL graduated cylinder. After registering the initial volume, the cylinder was mechanically tapped (30 tap/min, *Tecnociencia*, Spain) until a constant volume was achieved (El-Gibaly, 2002). The density was calculated as the mass divided by the volume (n = 3).

2.6. Evaluation of microspheres aerodynamic properties

Experimental mean count (number) aerodynamic diameters (NAD) of blank microspheres, were determined using a TSI Aerosizer® LD analyzer equipped with an Aerodisperser® (Amherst Process Instrument, Inc; Amherst, MA, U.S.A) (n = 3) whose measuring principle is based on direct time-of-flight measurements according to the following equation:

$$C_d \frac{\pi d^2}{4} \rho_a \frac{(V_a - V_p)^2}{2} = 1/6 \pi d^3 \rho_p \frac{dV_p}{dt} \quad (1)$$

Where C_d : particle drag coefficient, d : particle geometric diameter, ρ_a : air density, ρ_p : particle density, V_a : air velocity and V_p : particle velocity.

Theoretical aerodynamic diameters (d_{aer}) of some blank microspheres formulations, were calculated using the following formula:

$$d_{aer} = d * (\rho)^{1/2} \quad (2)$$

Where d is the Feret's particle diameter, and ρ is the particle density, which was obtained by SEM (on 100 particles) and Helium pycnometry, respectively, as described above.

2.7. Association of therapeutic proteins to microspheres

The potential of the CS microspheres as carriers of therapeutic macromolecules was investigated using IN and FITC-BSA as peptide and protein models, respectively, and two different association procedures.

In the *first association method*, the protein was dissolved in an appropriate solvent and incorporated into the CS solution before spray-drying it. When CS glutamate was used, IN and FITC-BSA (15% w/w based on CS) were dissolved in

25 ml of NaOH 0.01N or water, respectively. The solution was added to an equal volume of a (2% w/w) CS glutamate solution in water to have a 1% w/w of CS and mixed by magnetic stirring. In the case of CS acetate, IN (2, 12 and 24% w/w based on CS) was dissolved in HCl 0.1 N (1.5; 1.7; 3.4 ml), added to a 1% w/w CS solution in acetic acid 0.5N and mixed as before. CS solutions were spray-dried as described for blank microspheres.

In the *second association method*, the protein was adsorbed on the CS microspheres surface as follows. Pre-weighed amounts (20 mg) of blank CS glutamate microspheres were suspended in 0.5 ml of methanol (test tubes of 10 ml) and stirred by vortex mixing for 60 seconds. Then, 0.5 ml of the protein solution (0.9 mg/mL) in PBS pH 7.4 (IN previously dissolved in HCL or NaOH 0.01M; 200 µl/mg IN) were added and the suspensions were magnetically stirred for 30 minutes. Blank CS acetate microspheres were suspended in 0.5 mL of methanol (60 seconds by vortex mixing). Then, 0.5 ml of IN (0.3, 0.6, 0.9 mg/mL; previously dissolved in HCL 0.01M) in PBS were added and incubated (horizontal shaking, 120 rpm, Heidolph Promax 2020, Spain) at room temperature for 0.5, 1, 4 and 8 h at room temperature. The microspheres suspensions were centrifuged (5000 rpm, 15°C, 5 minutes) y/o filtered using membrane filters (0.45 µm filters unit *Millex®-HV*, low protein binding, U.S.A.) and freeze-dried (-30°, 24 hr, Labconco apparatus, Labconco Corp., Kansas City, MI, USA). Microspheres were stored as described before.

2.8. Determination of protein association efficiency and protein loading capacity of microspheres

Protein content of formulations produced by the *first association method* was determined following the microspheres incubation (test tubes of 10 mL) in prefixed volumes (CS acetate: 3 mL, CS glutamate: 6 mL) of PBS pH 7.4 under horizontal shaking (150 rpm, *Heidolf promax 2020*, Germany) at 37°C and 22°C, for FITC-BSA and IN, respectively, until the complete release of protein. The microspheres dispersions were filtered (0.45 µm filters unit *Millex®-HV*, low protein binding, U.S.A.) and the supernatants assayed for protein drug content by

measuring their absorbance at 562 nm for IN (*Micro BCA Protein Assay Reagent Hit, Pierce, Rockford, IL*) and at 494 nm for FITC-BSA (*UV-1603, Shimadzu, Japan*) (n = 2).

In the *second association method*, the quantity of protein adsorbed to the surface microspheres was calculated by the difference between the amount of protein in the medium before and after incubation, following separation of microspheres by centrifugation (CS acetate microspheres: 2500g, 30 min; CS glutamate: 10000g, 4°C, 40 min.). Non-associated protein remaining in the supernatant was measured by spectrophotometry at 277 nm and 494 nm, for IN and at FITC-BSA, respectively (*UV-1603, Shimadzu, Japan*) (n = 8).

The association efficiency (A.E.) to the microspheres and the microspheres loading capacity (L.C.) were determined as follows:

$$\text{A.E. (\%)} = \frac{\text{Total weight of associated protein}}{\text{Total protein weight}} \times 100$$

$$\text{L.C. (\%)} = \frac{\text{Total weight of associated protein}}{\text{Microspheres weight}} \times 100$$

2.9. *In vitro* release studies of insulin and FITC-BSA from CS microspheres

In vitro release studies of protein-loaded CS glutamate microspheres obtained by the *first association method* were performed as follows. Microspheres (2.5 mg of IN loaded microspheres, 375 µg of IN; 7 mg of FITC-BSA loaded microspheres, 1050 µg of FITC-BSA) were incubated (10 ml test tubes) in 6 ml of pH 7.4 phosphate buffer under horizontal shaking (150 rpm, *Heidolf promax 2020, Germany*) at 37°C. At pre-determined times (15, 30, 45, 60 and 120 min for IN and 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hr for FITC-BSA) the microparticles dispersions supernatants were filtered (0.45 µm filters unit *MILLEX®-HV, low protein binding, U.S.A.*) and assayed for drug release at 562 nm for IN (*Micro BCA Protein Assay*

Reagent Hit, Pierce, Rockford, IL) and at 494 nm for FITC-BSA (UV-1603, Shimadzu, Japan) (n = 2). *In vitro* release studies of IN-loaded CS acetate microspheres were carried out by incubating microspheres (12, 2 and 1 mg for microspheres with IN theoretical contents of 2, 12 and 24 %, respectively) in 3 mL of PBS 7.4, under horizontal shaking at 37°C. At pre-determined times (0.5, 1, 2, 4, and 8 hr) the microspheres dispersions were filtered and assayed as before.

IN-loaded microspheres prepared by the *second method* (adsorption) were assayed for drug release by incubating (10 mL test tubes, horizontal shaking, 120 rpm *Heidolf promax 2020*, Germany) reweighed amounts of microspheres in prefixed volumes (3 mg, 3 mL) of PBS pH 7.4 at 37°C. At prefixed times (0.5, 1, 2, and 3hr), samples were centrifuged (2500g, 5 min; Sigma Laborzentrifugen 2-15, Sigma Chemical Co., St Louis) and the supernatants filtered and assayed as indicated before.

3. Results and discussion

In this work, CS microspheres were prepared by a spray drying technique and were aerodynamically characterized *in vitro*. Furthermore, their ability to associate and deliver IN and FITC-BSA, selected as model therapeutic peptide and protein, respectively, was investigated; thus demonstrating their potential as pulmonary carriers of peptides and proteins. The CS microspheres were not crosslinked with pentasodium tripolyphosphate or reacylated with acetic anhydride as was previously claimed (Portero et al., 2002b; Anal et al., 2005), because we were aimed to produce microspheres with a high positive charge and, hence, mucoadhesive behavior. Furthermore, in the lung fluid pH, a fast dissolution of CS and release of the associated protein was not expected.

In the spray-drying process, the solvent in polymer droplets is removed very quickly due to heat energy provided in the spray-drier. Its thermal efficiency depends on the heat energy input (hence, on the inlet temperature), and the amount of heat needed in the evaporation process, which is related to the amount of the sample input. Taking this into account, we previously optimized the spray-

drying process variables (inlet and outlet air temperature, drying air flow rate, liquid feed rate) to obtain adequate production yields and powders with appropriate morphological and particle size. With the optimal conditions depicted in the Methodology section, the process yields were always higher than 60% and microspheres had good flow properties.

3.1. Morphological characterization of blank microspheres

In the first association method, the peptide IN and the protein FITC-BSA had to be previously dissolved in appropriate solvents. Therefore, the effect of adding an equivalent volume of sodium hydroxide to the CS solution (as explained in the methodology section) with the corresponding increase of pH and ionic strength was investigated. As can be observed in the representative SEM microphotographs shown in **Figure 1** and results depicted in **Table 1**, spherical rough microspheres with particle size of less than 2.2 μm , were obtained. Neither the morphology nor the particle size of the microspheres was influenced by the pH of the spray-dried solution or the type of CS. The two CS used to prepare the microspheres have a different Mw (CS base = 150 kDa, CS glutamate = 300 kDa) and type of salt and hence, their aqueous solutions would have different viscosities. Consequently, the droplets formed from the more viscous CS solution (glutamate) would be larger in size and result in larger microspheres. However, it was found that CS glutamate produced smaller particles than CS acetate. In this work, CS glutamate was dissolved in water and CS base in acetic acid, thus obtaining a chitosan glutamate and chitosan acetate solutions of pHs 5.0-5.7 and 3.5, respectively. It is known that CS swells at acidic pHs (Ginani et al., 1999; Orienti et al., 2002). At low pH, the amine groups of CS are protonated and this ionization induces electrostatic repulsions between the polymer segments (Khalid et al., 2002) with the subsequent expansion of the CS gel. The higher increase could occur for CS acetate gels, which could result in the formation of larger emulsion droplets and particles.

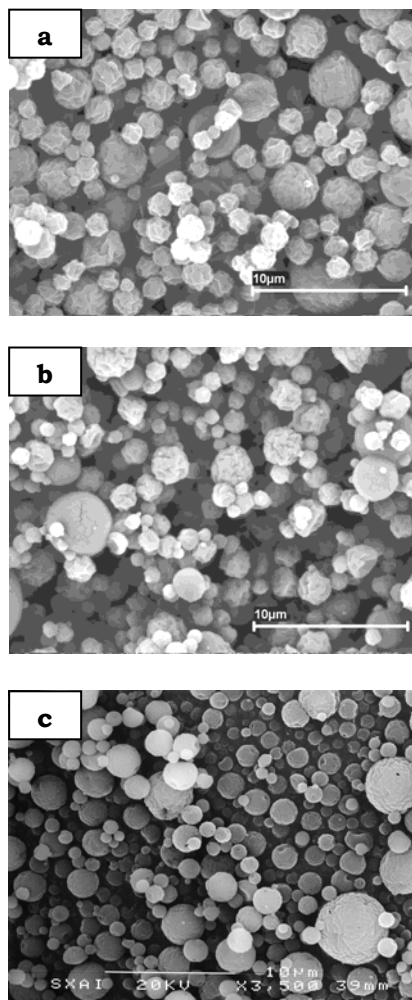


Figure 1. SEM microphotographs of blank microspheres prepared by spray-drying different polymer (1%, w/w) solutions: (a) chitosan glutamate solution in water, (b) chitosan glutamate solution in water: NaOH 0.01N (1:1) and (c) chitosan base solution in acetic acid 0.5M.

Table 1. Effect of type of chitosan solution pH and type of salt on the particle size of blank chitosan microspheres (mean \pm SD; n = 100).

CS salt	Aqueous solvent	CS solution pH	Mean particle size ² (μ m)
Glutamate	NaOH 0.01N ¹	5.67	1.88 \pm 0.83
Glutamate	H ₂ O ¹	4.99	1.62 \pm 0.70
Acetate	Acetic acid 0.5M	3.5	2.14 \pm 1.22

¹Solvent used to dilute the original 2% (w/w) chitosan glutamate solution. ²Feret's diameter obtained by optical microscopy.

3.2. Aerodynamic characterization of unloaded chitosan microspheres

As it has been previously mentioned, the particle size of a powder formulation intended for inhalation is, together with density, a key factor in its therapeutic success because they strongly influence its dispersion and *in vivo* sedimentation properties (Taylor and Kellaway, 2001; Courier et al., 2002). As the absorption of drugs into the systemic circulation is likely to occur more efficiently from the alveolar region, the density and aerodynamic size of particles to be aerosolized must be carefully characterized to guarantee reaching this deep site. It is well known that the cohesiveness of dry powders used for inhalation applications often hinders the accurate and reproducible particle size analysis. In this respect, the Aerosizer[®] with the Aerodipenser[®] equipment employed in this study provides a good dispersion of highly cohesive particles by a controlled de-agglomeration.

The real and apparent tap density values and theoretical and experimental diameters (calculated as indicated in the methodology section) of blank microspheres are shown in **Table 2**. Because the maximal deposition of particles in the deep lung regions occurs for aerodynamic diameters between 1-5 μ m (Vanbever et al., 1999), these microspheres, with aerodynamic diameters (NAD) in this range, should be considered adequate for alveolar deposition.

Table 2. Physical and aerodynamic properties of blank chitosan microspheres (mean \pm S.D.).

Chitosan salt	ρ_r (g/cm ³)	ρ_t (g/cm ³)	Feret diameter (μ m)	d_{aer} (μ m)	NAD (μ m)
Glutamate	1.14 \pm 0.05	0.21 \pm 0.02	1.76 \pm 0.90	1.86 \pm 1.09	1.92 \pm 1.61
Glutamate	1.25 \pm 0.01	0.31 \pm 0.01	1.98 \pm 0.65	2.21 \pm 1.05	2.33 \pm 1.75
Acetate	1.80 \pm 0.08	-	-	-	1.69 \pm 0.01

ρ_r : real density; ρ_t : apparent tap density; Feret's diameter (μ m) was determined from SEM microphotographs; d_{aer} : theoretical aerodynamic diameter; NAD: experimental mean count (number) aerodynamic diameter measured using an Aerosizer®.

3.3. Encapsulation of insulin and FITC-BSA within microspheres and *in vitro* release behavior

As explained in the methodology section, IN and FITC-BSA were incorporated as solutions in the CS solution to be spray-dried. Determination of encapsulation efficiencies of IN-loaded CS glutamate microspheres (prepared by the *first association method*) were performed at 22°C, in order to avoid peptide aggregation occurring at higher temperatures (Reithmeier et al., 2001). Nevertheless, only 80% of IN could be quantified, suggesting that a certain amount of aggregation should not be discarded. These high encapsulation results could be explained as follows: The pH of the spray-dried CS solution containing IN was 5.61 (**Table 3**) in which CS (pKa = 6.5) is positively charged, while IN (isoelectric point = 5.3) is either negatively charged or precipitated, favoring ionic interactions between both molecules and entrapment within the CS microspheres. Encapsulation efficiency of FITC-BSA could not be determined. The pH of the spray dried CS solution containing FITC-BSA was 5.08 in which FITC-BSA (isoelectric point 4.6) is negatively charged, favoring its ionic interaction with the positively charged CS. As shown in **Table 3**, particle size of the microspheres was not influenced by the type of encapsulated protein (IN or FITC-BSA) for the same theoretical drug content.

Table 3. Particle sizes as assessed by optical microscopy of protein loaded chitosan glutamate microspheres containing 15% (w/w) of protein theoretical content (mean \pm SD; n=100).

Aqueous solvent ¹	Protein	W phase pH	Mean particle size ² (μ m)
NaOH 0.01N	Insulin	5.61	1.67 \pm 0.78
H ₂ O	FITC-BSA	5.08	1.95 \pm 0.82

¹Used to dissolve the protein, ² Feret's diameter obtained by optical microscopy

Encapsulation efficiencies of CS acetate microspheres were also high (> 80%); due to the acidic pH of the solution in acetic acid (3.5), both CS and IN are positively charged. Then, the existence of other interaction forces such as hydrogen bindings or hydrophobic interactions could contribute to the association between CS and IN, as it has been previously suggested (Fernández-Urrusuno et al., 1999). Particle size (blank microspheres = 2.14 μ m) was significantly affected by the peptide loading (**Table 4**) especially from 12% to 24% of theoretical IN content. Nevertheless, sizes remain in the appropriate range for lung delivery for all the investigated insulin contents.

Table 4. Particles sizes, as assessed by optical microscopy, of insulin loaded chitosan acetate microspheres (mean \pm SD; n=100).

Insulin theoretical content (%)	Mean particle size ¹ (μ m)
2	2.27 \pm 1.27
12	2.68 \pm 1.32
24	4.18 \pm 3.24

¹ Feret's diameter

As can be observed in **Figures 2** and **3**, morphological appearance of microspheres was not dependent on the type of CS or the type and concentration of macromolecules incorporated.

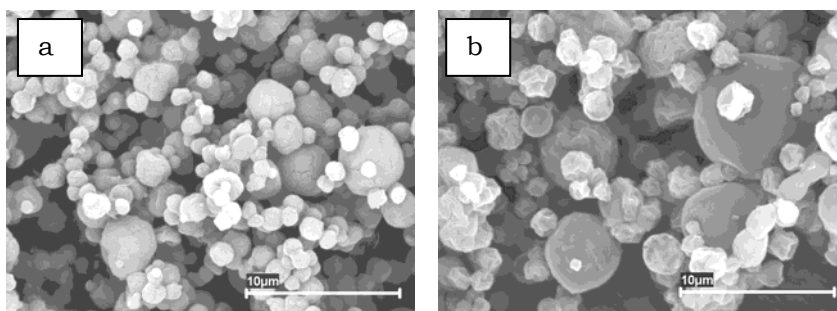


Figure 2. SEM microphotographs of chitosan glutamate microspheres containing (a) FITC-BSA and (b) insulin (protein theoretical content 15% (w/w) based on CS; insulin was previously dissolved in NaOH 0.01N).

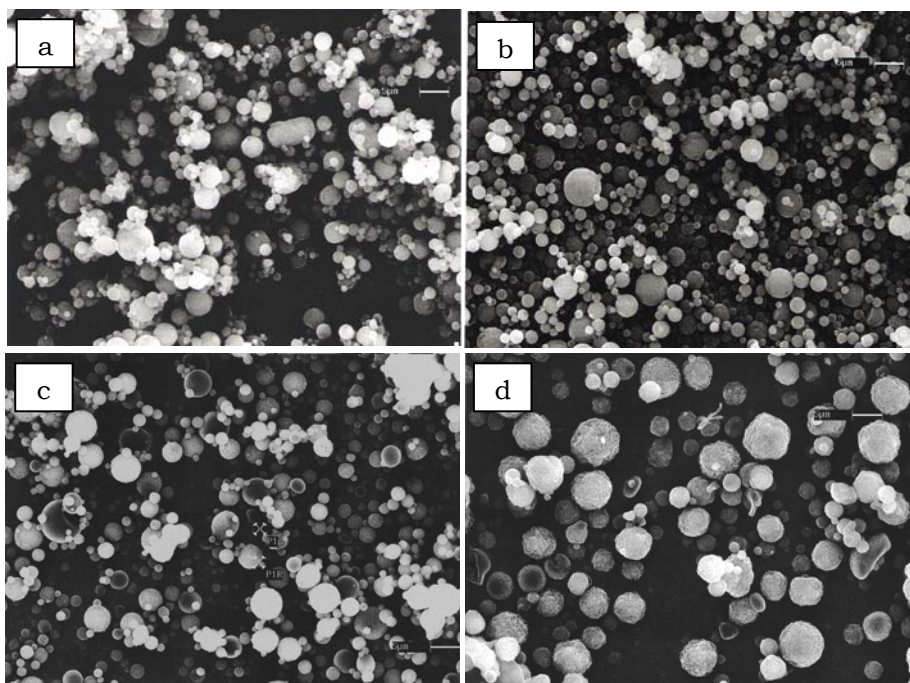


Figure 3. SEM microphotographs of chitosan acetate microspheres with: (a) 0%, (b) 2%, (c) 12% and (d) 24% (w/w) of insulin theoretical contents.

In vitro release profile of IN from CS glutamate microspheres (with IN theoretical content of 15% w/w), plotted in **Figure 4**, shows that IN release from CS glutamate microspheres (containing an IN theoretical content of 15% w/w) is fast, with 63% of peptide being released after 15 min. Then, peptide release rate dramatically decreased. The slight decrease in protein released at 90 min, could probably be explained by the aggregation phenomenon, previously mentioned.

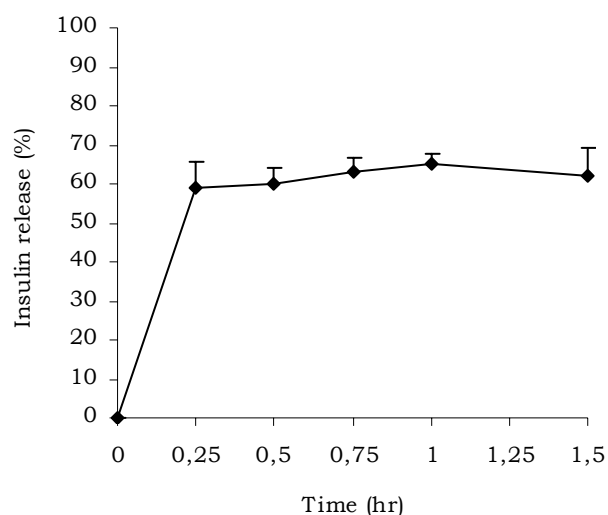


Figure 4. *In vitro* release of insulin from chitosan glutamate microspheres in PBS pH 7.4 at 37°C (for microspheres preparation, insulin was previously dissolved in NaOH 0.01N) (mean \pm SD; n = 3).

In contrast, FITC-BSA from CS glutamate microspheres was not detected during the *in vitro* release study and, consequently, its release profile could not be obtained under the selected conditions. The aqueous diffusion coefficient of a molecule is inversely related to its Mw (Polson, 1950). Therefore, it is likely that the high Mw of FITC-BSA could hinder its diffusion through the CS matrix. The mesh space available for diffusion in the hydrogels, which provides a useful size exclusion process for drug (peptide or protein) release by molecular diffusion, changes from the collapsed to the swollen states (Peppas, 1997). As the swelling of CS is greatly reduced at the pH 7.4, selected to carry out the *in vitro* release studies, it is probable that the mesh sizes available for FITC-BSA (7.2 nm)

diffusion were too small, therefore hindering the release of this protein. In contrast, the mesh spaces should have been large enough to enable easier diffusion of the peptide IN (molecular diameter = 2.2 nm) through the CS matrix.

IN release profiles from CS acetate microspheres containing different peptide theoretical loadings are shown in **Figure 5**. Peptide release from microspheres loaded with 2% (w/w) of IN was slow with less than 40% being released after 8 hr. However, nearly 40% of IN had been already released at 30 min, for 12% and 24% of IN- loaded microspheres. Thereafter, these two formulations differed in the amount released, the 12% loaded formulation being higher. Again, the amount of released IN decreased after 4 h, probably due to aggregation.

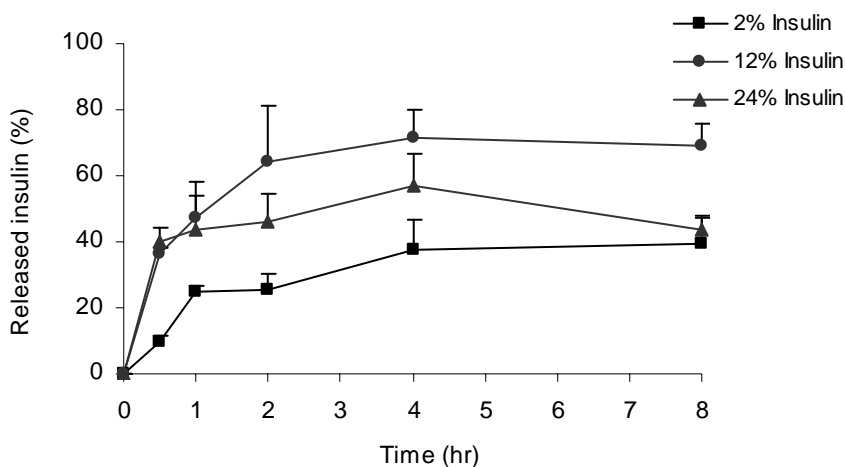


Figure 5. *In vitro* release of insulin from insulin loaded chitosan acetate microspheres with different peptide contents, in PBS pH 7.4 at 37°C (mean \pm SD; n = 3).

3.4. Association of insulin and FITC-BSA to the microspheres surface and *in vitro* release behavior

Previous experiments of CS acetate microspheres incubation in different solvents (PBS pH 7.4 and the mixtures (1:1) of PBS pH 7.4 and methanol, ethanol

and acetone) allowed us to identify PBS pH 7.4 and PBS pH 7.4:methanol (1:1) as the most adequate since they did not negatively affected the microspheres particle size, shape, morphology and dispersion during the duration of the experiment (**Figure 6**). In addition, from the observation of SEM microphotographs depicted in **Figure 7**, it can be confirmed that microspheres morphology was also not negatively affected by their incubation in IN solution.

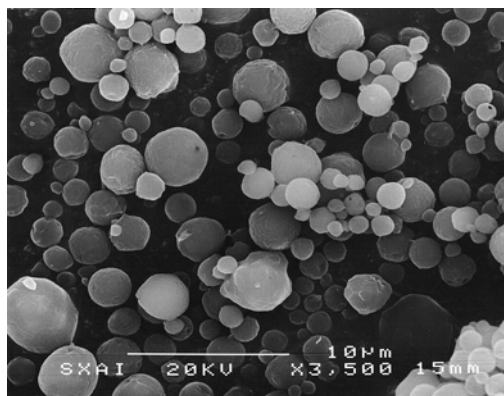


Figure 6. SEM microphotograph of chitosan acetate microspheres following incubation in: (a) methanol:PBS pH 7.4 (1:1) and (b) methanol, for 1 hr followed by freeze-drying.

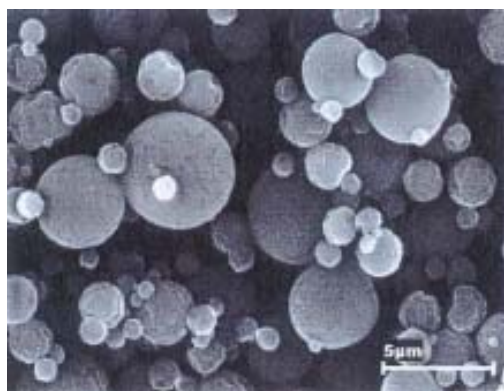


Figure 7. SEM microphotograph of chitosan acetate microspheres following incubation in an insulin solution (0.9 mg/mL) in methanol:PBS pH 7.4 (1:1) for 1 hr followed by freeze-drying.

Table 6 depicts the particle size and association efficiency data following incubation of CS acetate microspheres in IN solutions in different solvents. From these results it can be deduced that IN association efficiency of CS acetate microspheres increases with increasing the concentration of the peptide in solution, reaching values of association efficiency as high as 90%. The higher the number of IN carboxylic groups is, the higher the probability of interacting with the CS amino groups. In contrast, association efficiency decreases with the prolongation of the incubation time (data not shown) which might indicate that, in addition to adsorption, a desorption process of IN from CS microspheres occurs. It is important to note the existence of a linear relationship between IN concentration and association efficiency; which is important from a predictive point of view. As expected, there was also an effect of the solvent used to prepare the peptide incubation solution, the highest association efficiency being obtained with the mixture (1:1) PB pH 7.4:methanol.

Table 6. Effect of peptide concentration and type of solvent on particle size and insulin association to CS acetate microspheres (mean \pm SD; n = 3).

Incubation solvent	Insulin conc. (mg/mL)	Mean particle size (%)	Association efficiency (%)	Loading capacity (%)
PBS	0.90	2.37 \pm 1.42	54.64 \pm 1.46	-
PBS	1.80	2.74 \pm 1.17	57.85 \pm 2.24	-
PBS:Acetone	0.90	2.68 \pm 1.32	60.92 \pm 1.04	-
PBS:Ethanol	0.90	2.37 \pm 1.42	46.80 \pm 6.87	-
PBS:Methanol	0.45	2.33 \pm 1.26	40.42 \pm 3.95	0.87 \pm 0.08
PBS:Methanol	0.90	2.74 \pm 1.18	66.01 \pm 2.62	3.27 \pm 0.08
PBS:Methanol	1.80	2.23 \pm 0.44	84.37 \pm 2.45	7.59 \pm 0.22

PBS: phosphate buffer pH 7.6

Incubation experiments of CS glutamate microspheres in IN and FITC-BSA solutions in the same conditions (protein concentration: 0.9 mg/mL, incubation time. 30 min.) demonstrated that FITC-BSA association to the microspheres

surface was excellent, with values of approximately 100% association efficiency; whereas only 36.53-52.44% for IN, which corresponds to loading capacities of 1.38-2.55%, was associated to the same microspheres (**Table 7**). In previous works, high associations of IN to CS nanoparticles were reported at pHs in which both polyons were positively and negatively charged, respectively, which favored the ionic interactions (Fernández-Urrusuno et al., 1999). Nevertheless, a certain association was also obtained at pH 4 in which both, IN and CS, were positively charged, suggesting the existence of other interaction forces, such as hydrogen binding or hydrophobic interactions, which might contribute to the association between both species (Fernández-Urrusuno et al., 1999). Similar results were described for BSA (Calvo et al., 1997). In this work, the association studies were carried out at high pHs, in which both macromolecules are negatively charged and the amine groups of CS are not ionized, thus confirming the existence of the latter mentioned interaction forces. However, a higher association was obtained for FITC-BSA, suggesting stronger interactions between FITC-BSA and CS, compared to those between IN and CS.

Table 7. Association efficiencies of insulin to chitosan glutamate microspheres following their incubation in a peptide solution (0.9 mg/mL, insulin was previously dissolved in HCl 0.01M or NaOH 0.01M) in PBS pH 7.4 for 30 min (mean \pm SD; n \geq 3).

Insulin solvent ¹	pH of insulin solution in PBS	Association efficiency (%)	Loading capacity (%)
HCl 0.01M	7.2	36.70 \pm 3.02	1.38 \pm 0.25
NaOH 0.01M	7.7	52.45 \pm 4.94	2.55 \pm 0.48

¹ Solvent used to dissolve insulin previously to its incorporation to PBS PH 7.4

The differences in IN association between CS glutamate and CS acetate (see **Tables 6 and 7**) could be attributed to the different swelling behavior of the microspheres in the incubation medium. As it has been previously commented, CS glutamate and CS acetate, in addition to the differences in the type of salt, significantly differ in Mw (300kDa and 150kDa, respectively). It is known that

higher CS Mw swells less than lower CS Mw. In consequence, CS acetate microspheres, with a lower Mw and higher swelling properties, are expected to entrap higher amounts of IN.

In vitro release profiles plotted in **Figure 8** correspond to CS acetate microspheres with IN-adsorbed on their surface. The formulation containing 0.9% (w/w) IN exhibits the fastest release, delivering more than 70% of peptide after 1 hr. Furthermore, the lower the IN content, the faster its release. This could indicate that IN is mostly located on the microspheres surface.

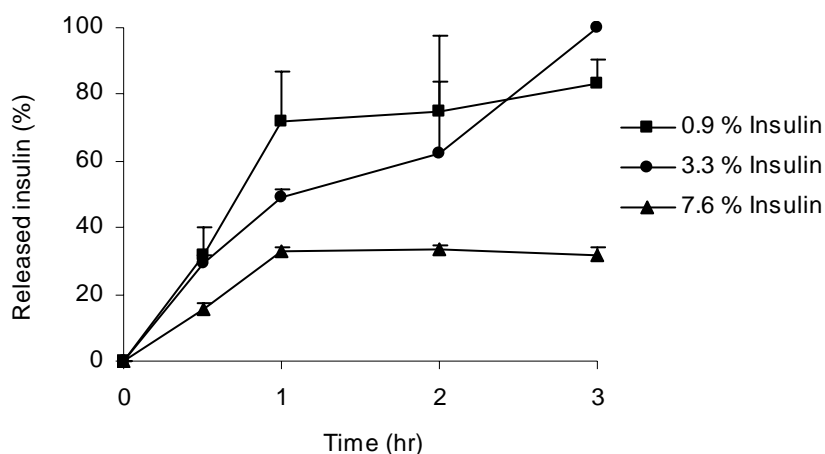


Figure 8. *In vitro* release of insulin from chitosan acetate microspheres produced by spray-drying and incubation of microspheres in a peptide solution (mean \pm SD; n = 6).

4. Conclusions

Chitosan microspheres with suitable morphological and aerodynamic properties for lung delivery were prepared by a simple spray-drying technique in an entirely aqueous medium. The microspheres have great potential as peptide and protein carriers, high insulin and FITC-BSA association efficiencies being obtained. *In vitro* release of insulin from chitosan microspheres loaded during the

spray-drying process, was fast while FITC-BSA loaded chitosan glutamate microspheres did not release the protein under the assayed conditions. Based on the previous considerations and acquired knowledge about the chitosan benefits by other administration routes, we hypothesized that the chitosan microspheres, with an aerodynamic diameter between 1 and 5 μm , once inhaled, would reach and deposit in the deep lung, where they would promote the macromolecule absorption.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Government (CICYT, SAF 2002-03314). The grants to D. Carrión by The International Cooperation Agency of Spain and The University of Santiago de Compostela are appreciated.

References

- Akbuğa, J., Bergisadi, N., 1999. Effect of formulation variables on cis-platin loaded microspheres properties. *J. Microencapsul.*, 16, 697-703.
- Anal, A. K., Stevens, W.F., Remuñán-López, C. Iontropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *Int. J. Pharm.* (in press).
- Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S.S., Illum, L., 1994. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.*, 11, 1358-1361.
- Aspden, T.J., Mason, J.D.T., Jones, N.S., Lowe, J., Skaugrud, O., Illum, L., 1997. Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on *in vitro* and *in vivo* mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J. Pharm. Sci.*, 86, 509-513.
- Behrens, I., Vila, A., Alonso, M.J., Kissel, T., 2002. Comparative uptake studies of bioadhesive and non bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle absorption and transport. *Pharm. Res.*, 19, 1185-1193.
- Borchard, G., Lußen, H.L., De Boer, G.A., Verhoef, J.C., Lehr, C.M., Junginger, H.E., 1996. The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption III: Effects of chitosan glutamate and carbomer on epithelial tight junctions *in vitro*. *J. Control. Release.* 39, 131-138.
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.*, 14, 1431-1436.
- Clark, A., 2002. Formulation of proteins and peptides for inhalation. *Drug Del. Syst. & Sci.* 2, 73-77.

- Courrier, H.M., Butz, N., Vandamme, T.F., 2002. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 19, 425-498.
- De Campos, A., Sánchez, A., Alonso, M.J., 2001. Chitosan nanoparticles : a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* 224, 159-168.
- Dornish, M., Hagen, A., Hansson, E., Peucheur, C., Vedier, F., Skaugrud, O., 1997. Safety of Protasan™: Ultrapure chitosan salts for biomedical and pharmaceutical use. In: Domard, A., Roberts, G.A.F., Varum, K.M. (Eds.), *Advances in chitin science*. Jacques Andre publisher, Lyon, pp. 664-670.
- El-Gibaly, I., 2002. Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.*, 249, 7-21.
- Evora, C., Soriano, I., Rogers, R.A., Shakesheff, K.M., Hanes, J., Langer, R., 1998. Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. *J. Control. Release.* 51, 143-152.
- Fernández-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1999. Enhancement of nasal absorption of IN using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.*, 16, 1576-1581.
- Genta, I., Pavanetto, F., Conti, B., Giunchedi, P., Conte, U., 1995. Improvement of dexamethasone dissolution rate from spray-dried chitosan microspheres. *STP Pharma Sci.*, 5, 202-207.
- Gehr, P., Green, F.H.Y., Geiser, M., Hof, V.I., Lee, M.M., Schurch, S., 1996. Airway surfactant, a primary defense barrier: mechanical and immunological aspects. *J. Aerosol Med.* 9, 163-181.
- Ginani, T.M.F., Navarro, M.V., Do Nascimento, E.G., De Oliveira, U.O.B., 1999. The study of influence of crosslinking and organic additives on the behaviour of chitosan gels. *Química Nova*, 22, 801-804.
- Grenha, A., Seijo, B., Remuñán-López, C., 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 25, 427-437.
- He, P., Davis, S.S., Illum, L. 1999. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int. J. Pharm.* 187, 53-65.
- Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I., 1988. Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administrations. *Polym. Mat. Sci. Eng.* 59, 897-901.
- Khalid, M. N., Agnely, F., Yagoubi, N., Grossiord, J.L., Couarraze, G., 2002. Water state characterization, swelling behaviour, thermal and mechanical properties of chitosan based networks. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15, 425-432.
- Knapczyc, J., Krówczyński, L., Krzck, J., Brzeki, M., Nirnberg, E., Schenk, D., Struscyk, H., 1989. Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical applications. In: Skak-Braek, B., Anthonsen, T., Sandford, P. (Ed.), *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, Elsevier, London, pp. 657-663.
- Kotze, A.F., de Leeuw, B.J., Lueßen, H.L., de Boer, A.G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., 1997. Chitosan for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.*, 159, 243-253.
- Kumbar, S.G., Kulkarni, A.R., Aminabhavi, T.M., 2002. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of cross-linking agent. *J. Microencapsul.*, 19, 173-180.

Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Schacht, E.H., Junginger, H.E., 1992. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int. J. Pharm.* 78, 43-48.

Lim, S.T., Forbes, B., Martin, G.P., Brown, M.B., 2001. In vivo and in vitro characterization of novel microparticulates based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS Pharm. Sci. Tech. (on line computer file)* 2, 4.

Machida, Y.P., Sannon, T., Nagri, T., 1991. Preparation of microspheres containing fluorouracil using the «dry-in-oil» method and its release characteristics. *STP Pharma Sci.*, 1, 363-368.

Muzzarelli, R.A.A., 1985. Chitin. In: Aspinall, G.O. (Ed.), *The polysaccharides* (Vol.3). Academic Press, Orlando, pp. 417-450.

Muzzarelli, R.A.A., 1997. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 131-140.

Orienti, I., Cerchiara, T., Luppi, B., Bigucci, F., Zuccari, G., Zecchi, V., 2002. Influence of different chitosan salts on the release of sodium diclofenac in colon-specific delivery. *Int. J. Pharm.*, 238, 51-59.

Patton, J.S., Platz, R.M., 1992. Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 8, 179-196.

Peppas, N.A., 1997. Hydrogels and drug delivery. *Colloid. Interface Sci.*, 2, 531-537.

Polson, A., 1950. Some aspects of diffusion in solution and a definition of a colloidal particle. *J. Phys. Colloid. Chem.*, 54, 649-652.

Portero, A., Remuñán-López, C., Nielsen, H.M., 2002a. The potential of chitosan in enhancing peptide absorption across the TR146 cell culture model- an in vitro model of the buccal mucosa. *Pharm. Res.*, 19, 169-174.

Portero, A., Remuñán-López, C., Criado, M. T., Alonso, M. J., 2002b. Reacetylated chitosan microspheres for controlled delivery of antimicrobial agents to the gastric mucosa. *J. Microencapsulation*, 19, 797-809.

Reithmeier, H., Herrman, J., Göpferich, A., 2001. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *J. Control. Rel.*, 73, 339-350.

Remuñán-López, C., Portero, A., Lemos, M., Vila-Jato, J.L., Núñez, M.J., Riveiro, P., Alonso, M.J., 2000. Chitosan microspheres for specific delivery of amoxicillin to the gastric cavity. *STP Pharm. Sci.*, 10, 69-76.

Rios, A., Gordillo, M.E., Bocanegra, C., Maldonado, J.A., 1994. Administración nasal e inhalatoria. In: Ramos, B.S., Aznar, M.D. (Eds.), *Administración de medicamentos: Teoría y práctica*. Diaz de Santos, Madrid, pp. 131-149.

Schipper, N.G.M., Vårum, K.M., Artursson, P., 1996. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm. Res.*, 13, 1686-1692.

Schipper, N.G.M., Olsson, S., Hoogstraate, J.A., deBoer, A.G., Vårum, K.M., Artursson, P., 1997. Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res.*, 14, 923-929.

Taylor, G., Kellaway, I., 2001. In: Hillery, M., Lloyd, A.W., Swerbrick, J., (Ed.), *Pulmonary drug delivery. Drug delivery and targeting for pharmacist and pharmaceutical scientists*, Taylor & Francis, London, pp. 269-300.

Tokumitsu, H., Ichikawa, H., Saha, T.K., Fukumori, Y., Block, L.H., 2000. Design and preparation of gadolinium-loaded chitosan particles for cancer neutron capture therapy. *STP Pharma. Sci.*, 10, 39-49.

Vanbever, R., Ben-Jebria, A., Mintzes, J.D., Langer, R., Edwards, D.A., 1999. Sustained release of insulin from insoluble inhaled particles. *Drug Dev. Research*, 48, 178-185.

Washington, N., Wilson, C.G., Washington, C., 1989. Pulmonary drug delivery. In: Washington, N., Wilson, C.G., Washington, C., (Eds.), *Physiological Pharmaceutics: Biological barriers to drug absorption*, Ellis Horwood Limited, Chichester, pp. 155-178.

Williams, R.O., Barron, M.K., Alonso, M.J., Remuñán-López, C., 1998. Investigation of a pMDI system containing chitosan microspheres and P134a. *Int. J. Pharm.*, 174, 209-222.

Yamamoto, H., Kuno, Y., Sugimoto, S., Takeuchi, H., Kawashima, Y., 2005. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J. Control. Rel.*, 102, 373-381.

***Parte I.2. Producción de microsferas de quitosano
utilizando una técnica de doble emulsificación aceite-
en-agua-en-aceite (O₁/W/O₂)/evaporación del disolvente***

Artículo 2

Development of a double emulsification-solvent evaporation method to produce chitosan microspheres for lung protein delivery

D. Carrión-Recio., J.L. Vila-Jato, C. Remuñán -López*

*Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,
University of Santiago de Compostela, Campus Sur, 15782-Santiago de Compostela,
Spain.*

* Corresponding author. Tel.: 00 34 981 563100 – ext. 14885;

Fax: 0034 981 547148

e-mail: ffcarelo@usc.es

Artículo sometido a evaluación por International Journal of Pharmaceutics

Abstract

In this work a new oil-in-water-in-oil double emulsion/solvent evaporation method was developed to prepare chitosan microspheres intended for pulmonary delivery. The microspheres morphology and particle size (ranging from 3.48 μm to 18 μm), determined using scanning electron microscopy and optical microscopy, respectively, were influenced by the pH of the chitosan aqueous solution and the type of inner organic phase as well as by the stirring rate. The mean particle size and the particle size distribution decreased when the stirring rate was increased. Two formulations with particle sizes of approximately 3.5 μm , as assessed by optical microscopy, were selected to investigate their aerodynamic properties. Their real densities varied between 1.46-1.48 g/cm^3 and their apparent tap densities were as low as 0.5-0.53 g/cm^3 , whereas the theoretical and experimental aerodynamic diameters, obtained using a TSI Aerosizer[®] LD, were smaller than 5 μm , making them promising for pulmonary drug delivery. The application of these microspheres as lung protein carriers was investigated using insulin and fluorescein isothiocyanate-labeled bovine serum albumin (FITC-BSA) as model compounds. Encapsulation efficiencies were excellent with values of 80% and 100% for insulin and FITC-BSA, respectively. The lower molecular weight of insulin and its weaker interaction forces with chitosan, probably favored its faster release rate from microspheres, compared to that of FITC-BSA.

Keywords: Chitosan microspheres, FITC-BSA, insulin, protein lung delivery.

1. Introduction

The topic and systemic delivery of large therapeutic molecules such as proteins and peptides to the lungs (Shen et al., 1999; Okamoto et al., 2000) has attracted tremendous scientific interest in recent years. Inhaled drugs can be absorbed, after deposition, in various parts of the respiratory tract (Washington et al., 1989), however the highest absorption occurs in the alveolar region owing to its large surface, extensive vasculature and very thin epithelium (Shen et al., 1999; Taylor and Kellaway, 2001). Before reaching the deep lung, drug particles must overcome certain obstacles and lung defense mechanisms, essentially the effect of the airway structure and the mucociliary escalator. Furthermore, once the aerosol particles or droplets are deposited in the lungs they can be rapidly engulfed by the alveolar macrophages which migrate to the tracheobronchial region and are cleared via the mucociliary escalator or are transported via the lymphatic system to lymph nodes and bloodstream (Taylor and Kellaway, 2001). The avoidance of these obstacles depends on shape, size and density (aerodynamic properties) as well as surface characteristics of the particles. From the above comments, it can be deduced that the prerequisite for the reliable and specific deep lung (alveolar) delivery of macromolecular drugs is the design of adequate drug carrier systems. The studies performed with traditional aerosolized powders of approximately 1 g/cm³ of density, have demonstrated that deposition in the oro-laryngeal space during breathing through the mouth occurs for particles larger than 10 µm while the tracheobronchial deposition is maximized for aerodynamic diameters between 8-10 µm. Furthermore, particles of 1-3 µm maximally deposit in the alveolar region while those particles possessing aerodynamic diameter smaller than 1 µm are mostly exhaled (Heyder et al., 1975; Gerrity et al., 1979; Clark and Egan, 1994). Nevertheless, nowadays the concept of particle lung deposition has completely changed with the design of a new type of microparticles of high porosity and/or low mass density (< 0.4 g/cm³) and large size (more than 5 µm), which may display improved flow and aerosolization properties as well as reduced phagocytic clearance (Edwards et al., 1997; Wang et al., 1997). In this respect, the use of microspheres that can be carefully tailored - by modifying the processing parameters - to have appropriate surface and

aerodynamic properties to the specific lung treatment or absorption site, has recently been proposed (Tripathi and Singh, 1992; Edwards et al., 1997; Bosquillon et al., 2001).

Chitosan (CS) is a cationic polysaccharide with an increasing importance as mucosal protein carrier because of its well-documented biocompatibility, low-toxicity (Hirano et al., 1989; Knapczyk et al., 1989; Aspden et al., 1997) and biodegradability in the rich lysozyme-containing mucus (Hirano et al., 1989; Aiba, 1993). CS is mucoadhesive (Lehr et al., 1992) and in solution can promote macromolecules permeation through well-organized epithelia (Aspden et al., 1992; Artursson et al., 1994; Schipper et al., 1996; Schipper et al., 1997; Kotze et al., 1997; Portero et al., 2002). CS nanoparticles have shown an excellent capacity for improving the peptide absorption through the nasal and intestinal epithelia (Fernández-Urrusuno et al., 1999; Calvo et al., 1997; Calvo et al., 1997a; Behrens et al., 2002) while mucoadhesive CS surface-modified PLGA nanospheres are useful for oral and pulmonary administration of peptide drugs such as elcatonin (Takeuchi et al., 2001; Yamamoto et al., 2005). Furthermore, it has been demonstrated that CS microspheres are able to enhance nasal absorption of the drug gentamicin in rabbits (Lim et al., 2001) and can be internalized by the stomach cells (Remuñán-López et al., 2000). Recently, we have proposed the microencapsulation of CS nanoparticles in microspheres with the aim of improving their administration by aerosolization (Grenha et al., 2005) and demonstrated that CS microspheres, which were obtained by spray-drying CS solutions or nanoparticles with no additional excipients, were compatible with the hydrofluoralkane P134a and, hence, adequate for lung delivery via pressurized dose inhalers (pMDI) (Williams et al., 1998).

CS microparticles have been prepared using several techniques such as simple emulsification (W/O)-solvent extraction/evaporation (Akbuğa and Bergisadi, 1999; Remuñán-López et al., 2000; Tokumitsu et al., 2000; Kumbar et al., 2002), ionotropic gelation (Kawashima et al., 1985; Bodmeier et al., 1989), dry-in-oil (Machida et al., 1991) and spray-drying (Genta et al., 1995). The aim of the present work was to develop, by a double emulsion/solvent evaporation

method, CS microspheres with appropriate morphological and aerodynamic characteristics able to reach and deposit in the alveolar region where the protein is expected to be delivered and absorbed. Thus, our hypothesis is that the CS microparticles would improve the pulmonary drug absorption by remaining in the absorption site for a prolonged period of time, interacting with the epithelial cells and opening the tight junctions of the cells as have been previously reported for CS nanoparticles (Yamamoto et al., 2005). The potential of these microspheres as protein carriers was investigated using insulin and FITC-BSA as model compounds.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The following chemicals were purchased from commercial suppliers and used as received: chitosan glutamate (CS) (Mw = 300 kDa, deacetylation degree > 80%) (*Pronova Lab.*, Norway); insulin, fluorescein isothiocyanate labelled bovine serum albumin (FITC-BSA), cottonseed oil (*Sigma Aldrich*, Spain); methylene chloride (*Romil*, Spain); ethyl acetate, n-hexane and toluene (*Merck*, Germany). Ultrapure water (*Milli-Q plus*, *Millipore Ibérica*, Spain) was used throughout.

2.2. Preparation of chitosan microspheres

CS microspheres were prepared by an oil-in-water-in-oil (O₁/W/O₂) double emulsification/solvent evaporation technique based on a previously described method (Remuñán-López et al., 2000), which was conveniently modified to allow the encapsulation of peptide/proteins and to produce microspheres with a reduced size. Briefly, a certain volume of an organic solvent (O₁) was emulsified in a CS solution (1% w/w in water, W phase) by sonication (10 sec., output 4, *Sonifier*[®] 250 *Branson*, United Kingdom) to form the first simple emulsion O₁/W. Then, this emulsion was added to cottonseed oil containing 0.1% w/w of Span[®] 85 (O₂ phase) to obtain the O₁/W/O₂ emulsion under mechanical stirring (*Janke & Kunkel/KA-WERK*, model RW 20 DZM, Germany). The system was stirred for 14 hr

at 37°C to allow the inner phase solvent to diffuse and evaporate from the CS phase and the polymer to precipitate. Microspheres were isolated by vacuum filtration using membrane filters (0.45 μm , white nylon, HNWP, 47 mm, *Millipore Corporation*, U.S.A.), washed with n-hexane and freeze-dried (-30°, 24 hr, *Labconco apparatus*, *Labconco Corp.*, Kansas City, MI, USA). Microspheres were stored in a dessicator at room temperature until their use.

In a preliminary study, the effect of the type of O₁ inner phase on the microspheres surface morphology was investigated by emulsifying 200 μl of four different organic solvents (methylene chloride, ethyl acetate, n-hexane, and toluene) in 3.2 ml of the W phase. This O₁/W emulsion was then added to 50 g of the O₂ phase under mechanical stirring (500 rpm).

In the subsequent studies, microspheres were obtained by emulsifying 600 μl of methylene chloride as O₁ phase into 9.6 ml of W phase. The O₁/W emulsion was added to 150 g of the O₂ phase and the effect of stirring rate was evaluated by selecting two mechanical stirring rates of 500 and 750 rpm. In addition, four different aqueous solvents (HCL 0.1N, NaOH 0.01N, phosphate buffered saline (PBS pH = 7.4) and water) were mixed with the CS solution (2% w/w) in a 1:1 proportion to form final 1% w/w CS solutions (W phase) with different pH_s, while keeping the mechanical stirring of 750 rpm constant.

In order to produce the protein loaded microspheres, the model proteins insulin and FITC-BSA (14.4 mg, 15% w/w with respect to CS) were previously dissolved in 4.8 ml of NaOH 0.01N and milli-Q water, respectively, added to 4.8 ml of a 2% w/w CS solution and mixed by vortex mixing (2400 min⁻¹, *Heidolph REAX 2000*, Germany) to obtain the W phase.

2.3. Characterization of microspheres size and surface morphology

To estimate the particle size of microspheres, their Feret's diameters (the measured distance between parallel lines that are tangent to the particle profile

and perpendicular to the ocular scale) were measured using an optical microscope (*Olympus BH-2*, Tokyo, Japan, $n = 100$).

Microspheres were placed on metal plates, coated with gold palladium to achieve a film of 70 nm thickness (*High Resolution Sputter Coater SC7640*, Thermo VG Scientific, England) and viewed using a scanning electron microscope (SEM, *JSM-6400*, Tokyo, Japan). For two of the formulations, of which the theoretical aerodynamic properties were obtained, the Feret's diameters were also calculated from SEM photographs.

2.4. Determination of microspheres density

Real densities of blank particles were determined by Helium pycnometry (*Micropycnometer, Quanta Chrome, model MPY-2*, U.S.A.) ($n = 3$). Their tap densities were calculated by placing pre-weighted amounts of powder, corresponding to 2 ml of volume, into a graduated cylinder. After registering the initial volume, the cylinder was mechanically tapped (30 taps/min, *Tecnociencia*, Spain) and volume readings were made until no further change of volume was observed (El-Gibaly, 2002). The density was estimated as the mass divided by the volume ($n = 3$).

2.5. Evaluation of microspheres aerodynamic properties

The experimental mean count (number) aerodynamic diameters (NAD) were determined using a TSI Aerosizer[®] LD analyzer equipped with an Aerodisperser[®] (*Amherst Process Instrument, Inc*; Amherst, MA, U.S.A) ($n = 3$) whose measuring principle is based on direct time-of-flight measurements according to the following equation:

$$C_d \frac{\pi d^2}{4} \rho_a \frac{(V_a - V_p)^2}{2} = 1/6 \pi d^3 \rho_p \frac{dV_p}{dt} \quad (1)$$

Where C_d : particle drag coefficient, d : particle geometric diameter, ρ_a : air density, ρ_p : particle density, V_a : air velocity and V_p : particle velocity.

The theoretical aerodynamic diameters (d_{aer}) of microspheres were calculated using the following formula:

$$d_{aer} = d * (\rho)^{1/2} \quad (2)$$

Where d is the Feret's particle diameter, and ρ is the particle density, which were obtained by SEM (on 100 particles) and Helium pycnometry, respectively, as described above.

2.6. Determination of protein encapsulation efficiency of the microspheres

The microspheres drug content was obtained following their incubation (test tubes of 10 ml) in 6 ml of phosphate buffer pH 7.4 (2.5 mg of insulin loaded microspheres, 62.5 μ g/ml of insulin; 7 mg of FITC-BSA loaded microspheres, 175 μ g/ml of FITC-BSA) under horizontal shaking (150 rpm, *Heidolf promax 2020*, Germany) at 37°C and 22°C, for FITC-BSA and insulin, respectively, until the complete release of protein (24 hr for insulin and 96 hr for FITC-BSA). The microspheres suspensions were filtered (0.45 μ m filters unit *MILLEX®-HV*, low protein binding, U.S.A.) and the supernatants assayed for protein drug content by measuring their absorbance at 562 nm for insulin (*Micro BCA Protein Assay Reagent Hit*, *Pierce*, Rockford, IL) and at 494 nm for FITC-BSA (*UV-1603*, Shimadzu, Japan) (n = 2).

The microparticles protein encapsulation efficiency (E.E.) was calculated as follows:

$$E.E.(%) = [\text{Total protein amount} - \text{Free protein amount}] / \text{Total pretein amount} \times 100$$

2.7. *In vitro* release studies

The *in vitro* release studies were performed by incubating (10 ml test tubes) samples of microspheres (2.5 mg of insulin loaded microspheres, 375 µg of insulin; 7 mg of FITC-BSA loaded microspheres, 1050 µg of FITC-BSA) in 6 ml of pH 7.4 phosphate buffer under horizontal shaking (150 rpm, *Heidolf promax 2020*, Germany) at 37°C. At pre-determined times (15, 30, 45, 60 and 120 min for insulin and 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hr for FITC-BSA) the microparticles dispersions supernatants were filtered (0.45 µm filters unit *MILLEX®-HV*, low protein binding, U.S.A.) and assayed for drug release as indicated above (n = 3).

2.8. Statistical analysis

Mann-Whitney Rank Sum Test and Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (with the Pairwise Multiple Comparison Procedure Student-Newman-Keuls method) were used to examine statistical significances between two or multiple groups (SigmaStat Statistical program, *Systat Software Inc.* version 3.10). Differences were considered significant if $P < 0.05$.

3. Results and discussion

A double emulsion ($O_1/W/O_2$)/solvent evaporation microencapsulation technique was developed which allows the production of CS microparticles displaying different morphologies and aerodynamic sizes. Following the addition of a previously formed O_1/W emulsion into an oily phase (O_2), we expected the rapid diffusion of the organic inner solvent (O_1 phase) into the outer O_2 phase through the W phase containing the polymer CS and the formation of porous or irregular structures. A double emulsification $O_1/W/O_2$ evaporation method was also used by Pavanetto et al (Pavanetto et al., 1996) to prepare drug loaded CS microspheres. However, in that work no proteins were encapsulated, the drug (ketoprofen) was dissolved in methylene chloride (O_1) and the polymer was crosslinked by adding a 5% glutaraldehyde aqueous solution to the multiple emulsion. Furthermore, the 90% of microspheres had a particle size of 5.74 -

24.80 μm , which is not suitable for pulmonary delivery. In our work, we propose the encapsulation of hydrophilic high molecular weight compounds such as proteins and peptides and avoid the use of toxic aldehydic crosslinking agents. In addition, the particle size was reduced to make it adequate for pulmonary delivery. The first part of our work was focused on the investigation of the effect of different process variables such as the type of inner organic phase, the aqueous phase pH and the stirring rate on the morphology and size (Feret's diameter) of the CS microspheres. The second part of this work was centered on the assessment of the aerodynamic properties of those formulations which were more appropriate for pulmonary delivery, according to the previous studies. Finally, the ability of these microspheres to associate and release therapeutic macromolecules was evaluated using insulin and FITC-BSA as peptide and protein models.

3.1. Microspheres preparation, morphological characterization and protein association

The effect of the type of solvent (methylene chloride, ethyl acetate, toluene and n-hexane) used as O_1 inner phase emulsified in the CS phase, was investigated while keeping the W phase (CS solution at 1% w/w in water) and the stirring rate (500 rpm) constant. All the solvents selected as inner phase were miscible with the cottonseed oil used for external phase (Bodmeier et al., 1994). The results demonstrated that the microspheres surface appearance and morphology was strongly affected by the type of O_1 phase. In fact, the SEMs microphotograph depicted in Fig. 1 show that microspheres obtained using ethyl acetate and especially n-hexane and toluene had a very irregular surface and an apparent non-dense structure and hence, it was difficult to measure their size by optical microscopy.

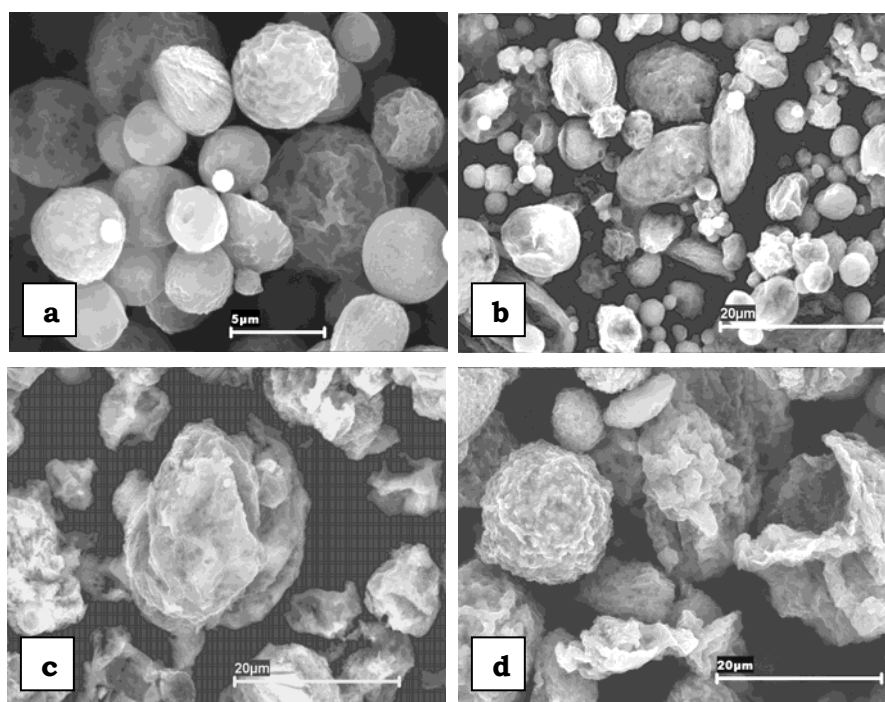


Figure 1. Scanning electron micrograph of chitosan microspheres prepared using (a) methylene chloride, (b) ethyl acetate, (c) toluene and (d) n-hexane as O₁ phase (O₁: 200 μl; W: 3.2 ml of CS solution 1% w/w in water; O₂: 50 g of cottonseed oil-0.1% Span[®] 85; 500 rpm).

On the other hand, methylene chloride yielded microspheres that were spherical in shape, with particle sizes varying between 1 and 15 μm, as assessed by optical microscopy. It has been suggested that the rapid evaporation of organic solvent during the preparation method might produce microparticles with some irregularity on their surface (Tice and Gilley, 1985). In this double emulsification O₁/W/O₂ evaporation method, the organic solvent must first diffuse through the CS polymer phase towards the external cottonseed oil phase before it can be removed by evaporation. Then, the differences in the microparticles texture could be the result of differences in the diffusion rates of the organic solvents into the cottonseed oil medium, which are determined by their different miscibility degrees or solubilities in cottonseed oil. As expected, according to the dielectric constant (CD) (parameter indicative of the solubility), the roughest surfaces were

obtained when less polar solvents were used, such as n-hexane (CD=1.9) and toluene (CD=2.4). Ethyl acetate and methylene chloride, display a relatively higher polarity (CD=6 and 9, respectively), thus rendering slightly rough surfaces compared to those obtained with n-hexane and toluene. However, methylene chloride was selected for the preparation of the microspheres to carry out the following studies because the smallest microspheres size obtained ($6.45 \pm 3.42 \mu\text{m}$).

In order to demonstrate the versatility of the developed technique to produce microspheres with different compositions, a lipid nucleus was incorporated in the CS microspheres by dissolving 30 mg of Dynasan®116 in methylene chloride (O₁ phase). Spherical rough microspheres with particle size of 1 to 15 μm were obtained (Fig. 2) which were apparently no different from those prepared with no lipid.

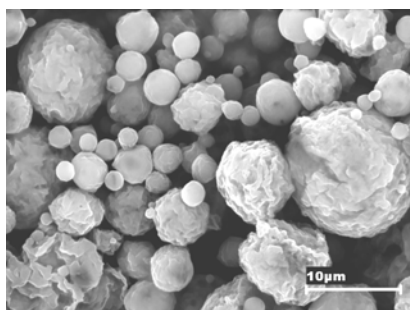


Figure 2. Scanning electron micrograph of chitosan microspheres prepared using a solution of Dynasan® in methylene chloride as O₁ phase (O₁: 200 μl ; W: 3.2 ml of CS solution 1% w/w in water; O₂: 50 g of cottonseed oil-0.1% Span® 85, 500 rpm).

Afterwards, the production batch size was increased by using proportionally higher volumes as indicated in the methodology section. In consequence, the microspheres particles size had to be adjusted to the new preparation conditions. Therefore, the effect of stirring rate on the size and morphology of the microspheres prepared using methylene chloride as O₁ phase

was evaluated. As shown in Table 1, the mean particle size and the standard deviation of CS microspheres were considerably influenced by the stirring rate used during the emulsification step.

Table 1. Effect of the emulsification stirring rate on the particle size of the microspheres (W= 9.6 ml of CS solution 1% w/w in water, n=100).

Stirring rate (rpm)	Mean particle size (μm)
500	8.00 ± 6.69
750	$3.49 \pm 1.58^*$

(*) statistical significance $P < 0.05$

Particles obtained with 500 rpm, had a considerably wider particle size distribution in comparison with those obtained using 750 rpm ($P < 0.05$), which were also more spherical (see Fig. 3).

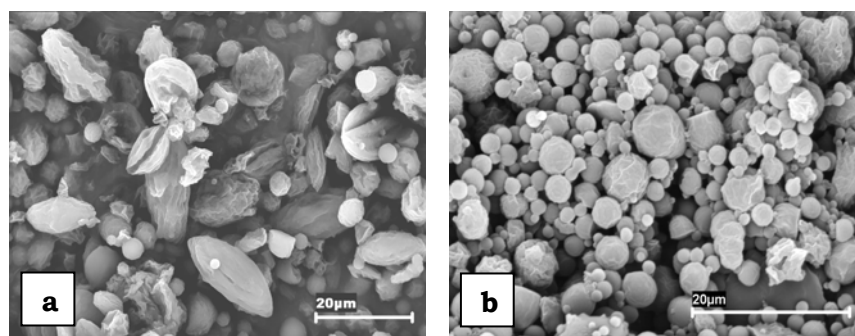


Figure 3. Scanning electron micrograph of chitosan microspheres prepared using methylene chloride as O_1 phase and (a) 500 rpm, (b) 750 rpm (O_1 : 600 μl ; W: 9.6 ml of CS solution 1% w/w in water; O_2 : 150 g of cottonseed oil-0.1% Span[®] 85).

It is known that at higher stirring rates, finer emulsions are obtained as a consequence of the higher shear forces produced, which finally causes the formation of smaller microspheres (8 μm and 3.49 μm for 500 rpm and 750 rpm, respectively). Additionally, a more intense agitation prevents the agglomeration of the “immature microspheres” resulting in a narrowing of the particle size distribution (Mateovic et al., 2002). Therefore, the stirring rate of 750 rpm was selected as the optimum to perform the following studies. This selection was also based on the fact that aerosols comprising small spherical particles of mass density near 1 g/cm^3 and a mean geometric diameter between 1 and 3 μm , are suitable for particle penetration into the airways or lung periphery (Edwards et al., 1998). A mixture acetone:methylene chloride in a volume ratio of 1:1 was used as O_1 phase to evaluate a further modification of the inner organic solvent on the microsphere size and appearance. However, differences were not observed, this mixture produced particles which were similar in size and appearance to those obtained using only methylene chloride (Fig. 4).

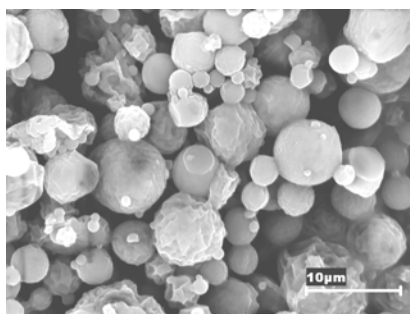


Figure 4. Scanning electron micrograph of chitosan microspheres prepared using methylene chloride/acetone as O_1 phase (O_1 : 600 μl ; W: 9.6 ml of CS solution 1% w/w in water; O_2 : 150 g of cottonseed oil-0.1% Span[®] 85; 750 rpm).

In order to investigate the suitability of CS microspheres to associate therapeutics peptides and proteins, insulin (MW = 5.7 KDa; isoelectric point = 5.3) and FITC-BSA (MW = 69 KDa; isoelectric point = 4.6) were selected as models proteins. The appropriate solvent for their dissolution prior to the incorporation into the polymer solution, were first identified. Taking into account that insulin dissolves well in HCL 0.1N (pH = 1.1) and NaOH 0.01N (pH = 12.1), and FITC-BSA in phosphate buffered saline (PBS pH = 7.4) and in milliQ water (pH = 6.16), the effect of the addition of these four aqueous solvents to the original CS aqueous solution, on the particle size of the blank CS microspheres was evaluated. The pH of the resulting W phase was not adjusted, thus each aqueous solvent produces a different pH of the W phase. The results displayed in Table 2 demonstrate that, as expected, the microspheres particle size was strongly affected by the pH of the CS solution.

Table 2. Effect of the W aqueous phase pH and the protein loading, on the particle size of the microspheres (mean \pm SD; n=100).

Aqueous solvent	W phase pH	Protein	Mean particle size (μm)
HCL 0.1 N	2.10	-	17.66 \pm 9.15
NaOH 0.01N	5.67	-	3.48 \pm 1.53
NaOH 0.01N	5.61	Insulin (15 %)	5.98 \pm 3.35
PBS 7.4	5.63	-	6.55 \pm 3.96
H ₂ O	4.99	-	3.49 \pm 1.58
H ₂ O	5.08	FITC-BSA (15 %)	3.92 \pm 1.92

The inclusion of HCL 0.1N in the W phase produced spherical microspheres (Fig. 5) with a particle size which was significantly higher ($P < 0.05$) than those obtained when the more basic pH solutions (due to H₂O, PBS 7.4 or NaOH 0.01N) were used, thus being inadequate for pulmonary administration.

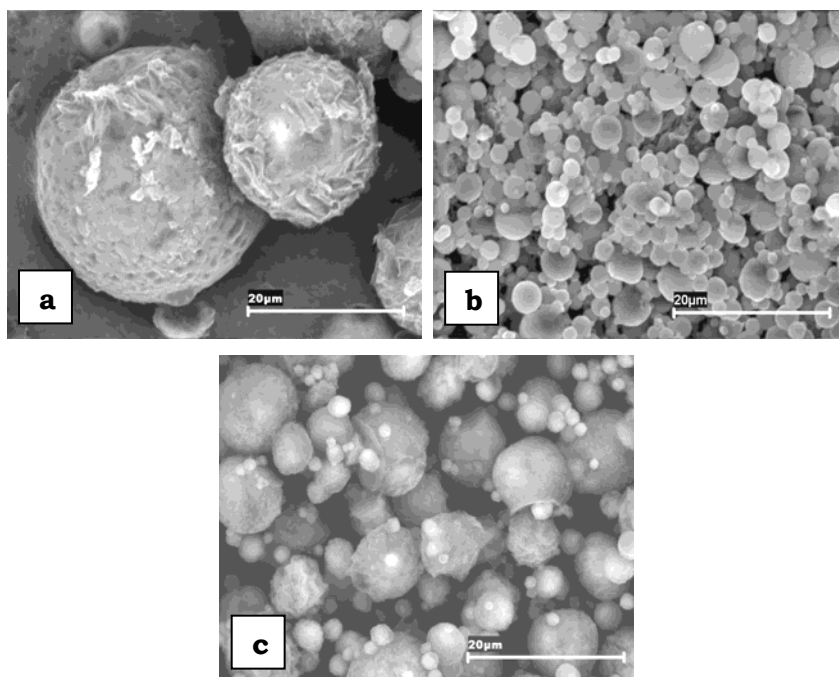


Figure 5. Scanning electron micrograph of chitosan microspheres prepared using methylene chloride as O₁ phase and a 1:1 mixture of chitosan solution 2% w/w in water and (a) HCL 0.1N, (b) NaOH 0.01N, (c) PBS 7.4 as W phase (O₁: 600 µl; O₂: 150 g of cottonseed oil-0.1% Span[®] 85; 750 rpm).

Significant differences in particle sizes were found between H₂O and PBS 7.4 or PBS 7.4 and NaOH 0.01N but not between H₂O and NaOH 0.01N ($P < 0.05$). These differences in particle size could be explained by the high susceptibility of CS to swell at acidic pH_s (Ginani et al., 1999; Orienti et al., 2002). In fact at low pH, the amine groups of CS are protonated and this ionization induces electrostatic repulsions between the polymer segments (Khalid et al., 2002) and the subsequent expansion of the CS gel. This increase in the

volume of CS gel (Ginani et al., 1999) could explain the formation of larger inner phase emulsion droplets and, consequently, larger particles when HCL 0.1N was included in the W phase. Therefore, the aqueous solvent selected to dissolve insulin was NaOH 0.01N which yielded loaded microspheres of approximately 6 μm (Fig. 6).

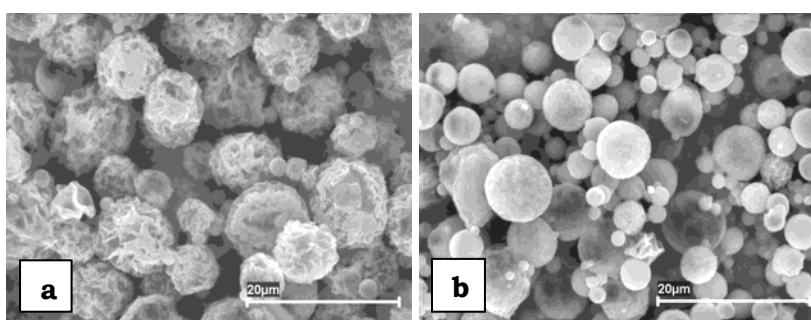


Figure 6. Scanning electron micrograph of chitosan microspheres prepared using methylene chloride as O_1 phase and a 1:1 mixture of chitosan solution 2% in water and (a) solution of insulin in NaOH 0.01N, (b) solution of FITC-BSA in water as W phase (O_1 :600 μl ; 150 g of cottonseed oil-0.1% Span[®] 85; 750 rpm).

Water produced a smaller particle size (approximately 4 μm) and a more homogeneous size distribution (according to the standard deviation) than PBS 7.4 and was selected as the most appropriate aqueous solvent for FITC-BSA. Moreover, the microphotographs depicted in Fig. 6, show that the insulin microspheres had a more pronounced rough surface than FITC-BSA particles. The differences in surface roughness between insulin and FITC-BSA loaded microspheres could be explained by some insulin precipitation at the microspheres production pH (5.61), which is very close to the isoelectric point of the insulin (5.3).

3.2. *In vitro* aerolization properties

Since the absorption of drugs into the systemic circulation is likely to occur more efficiently from the alveolar region (Taylor and Kellaway, 2001), the

size of particles to be aerosolized must be carefully characterized to guarantee that they can reach this deep region. In this respect, it is well known that the cohesiveness of dry powders used for inhalation applications often hinders the accurate and reproducible particle size analysis. The Aerosizer[®] with the Aerodisperser[®] Particle Instruments/Amherst System, which provides a good dispersion of highly cohesive particles by a controlled de-agglomeration, was used in the present investigation to measure experimental mean size distributions. Real and apparent densities as well as theoretical aerodynamic diameters were calculated as indicated in the methodology section.

Table 3 shows the results of real and tap densities and theoretical and experimental aerodynamic diameters corresponding to the blank particles prepared using NaOH 0.01N and H₂O as aqueous solvents.

Table 3. Real density (ρ_r), tap density (ρ_t), particle size (Feret's diameter), theoretical aerodynamic diameter and experimental aerodynamic diameter (NAD) values of the blank microspheres measured using the Aerosizer[®].

Aqueous solvent	ρ_r (g/cm³)	ρ_t (g/cm³)	Particle size* (μm)	d_{aer} (μm)	NAD (μm)
NaOH	1.48 ± 0.03	0.53 ± 0.002	3.01 ± 1.07	3.67 ± 1.07	4.35 ± 1.85
H ₂ O	1.46 ± 0.03	0.50 ± 0.01	2.64 ± 1.10	3.19 ± 1.10	3.52 ± 1.77

* Feret's diameter obtained from SEM; d_{aer} , theoretical aerodynamic diameter, NAD, mean count (number) aerodynamic diameter.

The real density values used in the calculation of aerodynamic diameters were similar for the two formulations. Furthermore, tap densities, with values of 0.50-0.53 g/cm³, are considered low enough to reach the alveolar region. Taking into account that maximal deposition of particles in the alveolar region occurs for aerodynamic diameters between 1-5 μm , both formulations of microspheres, with

theoretical and experimental aerodynamic diameters smaller than 5 μm , are considered adequate for alveolar deposition.

3.3. Encapsulation efficiency and in vitro release of Insulin and FITC-BSA from microparticles

CS microspheres show high protein encapsulation efficiencies. The determination of encapsulation efficiency of insulin was performed at 22°C to avoid peptide aggregation reported at higher temperatures (Reithmeier et al., 2001). Even though only 80% of insulin could be quantified, we have rejected the hypothesis that the peptide could have diffused into the external phase during the production of microspheres, due to the low solubility of the peptide in the oil phase. Therefore, the obtained encapsulation results suggest that some aggregation or surface adsorption has occurred. On the other hand, FITC-BSA encapsulation efficiency was excellent with values of 100%. To explain the high protein encapsulations observed, it is necessary to point out that during the production of the insulin-loaded microspheres, the pH of the CS solution (pKa=6.5) was 5.61 (Table 2). At this pH, CS is positively charged, while the insulin (isoelectric point 5.3) has a negative charge, favoring ionic interactions between both molecules and consequently, the association of insulin with CS. However, as indicated above, some precipitation of insulin during the process has occurred. With respect to the FITC-BSA loaded microspheres, the pH of the CS solution was 5.08 (Table 2) in which CS was positively charged, while the FITC-BSA (isoelectric point 4.6) was negatively charged. As in the case of insulin, it can be deduced that electrostatic interactions between the acidic groups of FITC-BSA and the amine groups of CS exist. In previous studies where the associations of insulin and albumin (BSA) to CS nanoparticles were investigated, high entrapment efficiencies were reported not only at pHs of the CS solutions in which both proteins and CS were negative and positively charged, respectively, but also at pHs in which both polyons were predominantly positively charged (Insulin, pH=4.3; FITC-BSA, pH=3 and 4) (Calvo et al., 1997; Fernández-Urrusuno et al., 1999). As a consequence, the existence of other interaction forces such as hydrogen bindings or hydrophobic interactions that may contribute to the

association between CS and both insulin and FITC-BSA have been suggested (Calvo et al., 1997; Fernández-Urrusuno et al., 1999). We have studied the adsorption of insulin and FITC-BSA to blank microparticles in pH 7.4 (data not shown) in which both macromolecules are negatively charged and the amine groups of CS are not ionized. Our results reaffirm the proposed association mechanisms (hydrogen bindings or hydrophobic interactions) of these active macromolecules to CS. However, we have obtained a higher association for FITC-BSA with values of 100% whereas 65% for insulin. This fact suggests that the interaction between FITC-BSA and CS are stronger.

Unlike encapsulation efficiency studies, *in vitro* release studies were carried out at 37°C to mimic the physiological temperature. The *in vitro* release profile plotted in Fig. 7 shows that insulin release was fast, with 42% being released at 15 min.

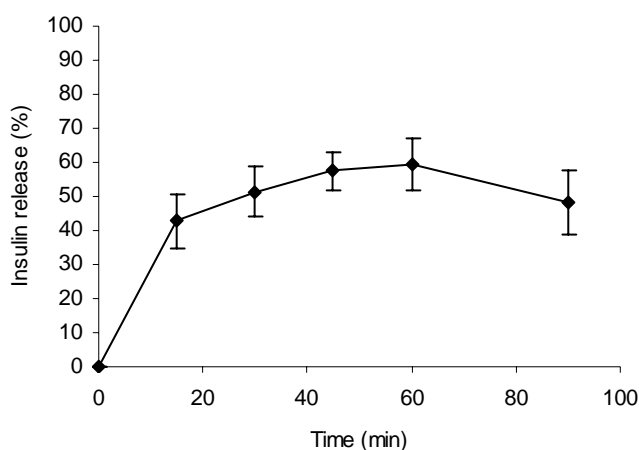


Figure 7. In vitro release of insulin from CS microspheres in PBS 7.4 at 37°C (O₁ phase: 600 µl of methylene chloride; W phase: 1:1 mixture of chitosan solution 2% in water and solution of insulin in NaOH 0.01N, 15% w/w based on CS; O₂: 150 g of cottonseed oil-0.1% Span[®] 85; 750 rpm; mean ± SD; n = 3).

At the pH 7.4 used to investigate the release behaviour of insulin from particles, the absence of ionization of CS amine group and the negative charges of

the peptide results in the dissociation between insulin and CS, thus allowing the fast release of the peptide. The decrease in the drug concentration that occurs at 90 min may be due to the phenomenon of aggregation of insulin at 37°C or surface adsorption, previously discussed. A drastically different pattern was, however, observed for FITC-BSA microspheres (Fig. 8).

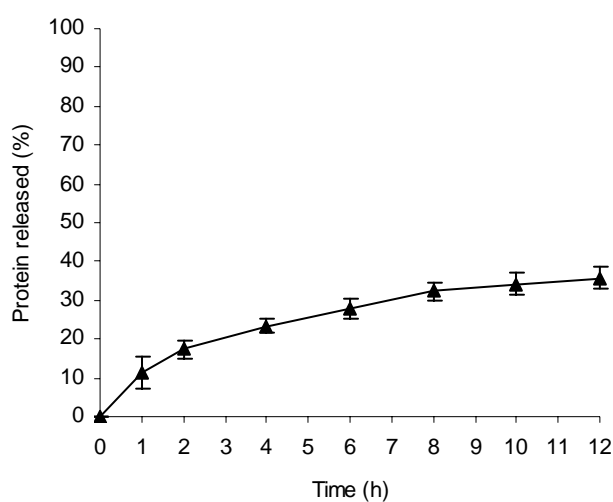


Figure 8. In vitro release of FITC-BSA from CS microspheres (O₁ phase: 600 µl of methylene chloride; W phase: 1:1 mixture of chitosan solution 2% in water and solution of FITC-BSA in water, 15% based on CS; O₂: 150 g of cottonseed oil-0.1% Span[®] 85; 750 rpm; mean ± SD; n = 3).

The very slow release rate of FITC-BSA could be the result in part of the previously suggested stronger interaction (electrostatic interactions, hydrogen bindings or hydrophobic interactions) between FITC-BSA and CS, hindering the diffusion process of FITC-BSA through CS and retarding its release. On the other hand, it is known that the aqueous diffusion coefficient of a molecule is inversely related to the molecular weight (Polson, 1950). The mesh space available for diffusion, in the hydrogels, changes between the collapsed and the swollen states, which provides a useful size exclusion process for drug, peptide or protein release, by molecular diffusion (Peppas, 1997). As the swelling of CS is strongly reduced at the pH 7.4 used to carry out the release studies, it is probable that the mesh sizes

available for FITC-BSA (7.2 nm) diffusion are small, therefore controlling the release of this protein. In the case of the insulin, due to its smaller molecular diameter (2.2 nm), the mesh spaces could have been large enough to enable easier diffusion of the peptide through the CS matrix.

4. Conclusions

CS microspheres with suitable morphological and aerodynamic properties for lung delivery were prepared by a new developed double emulsion solvent evaporation technique. Taking into account that aerosol deposition in the respiratory tract is related to aerodynamic diameter, some of the formulations are expected to deposit and release the drug in the alveolar region, where the CS is presumed to be able to interact with the epithelial cells, opening the tight cells junctions and promoting the protein transport. Furthermore, CS microparticles were shown to encapsulate insulin and FITC-BSA efficiently; their release behaviour profiles were different, which is probably due to differences in their different molecular weights and interactions forces with the CS.

Acknowledgments

This work was supported by Xunta de Galicia (PGIDT00PXI20315PR) and the Spanish Government (CICYT, SAF 2002-03314). The grants to D. Carrión from Agencia Española de Cooperación Internacional and by the USC are appreciated.

References

- Aiba, S.I., 1993. Studies on chitosan: relationship between N-acetyl group distribution pattern and chitinase digestibility of partially N-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 15, 241-245.
- Akbuğa, J., Bergisadi, N., 1999. Effect of formulation variables on cis-platin loaded microspheres properties. *J. Microencapsul.*, 16, 697-703.
- Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S.S., Illum, L., 1994. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.*, 11, 1358-1361.

- Aspden, T.J., Mason, J.D.T., Jones, N.S., Lowe, J., Skaugrud, O., Illum, L., 1997. Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on *in vitro* and *in vivo* mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J. Pharm. Sci.*, 86, 509-513.
- Behrens, I., Vila, A., Alonso, M.J., Kissel, T., 2002. Comparative uptake studies of bioadhesive and non bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle absorption and transport. *Pharm. Res.*, 19, 1185-1193.
- Bodmeier, R., Chen, H., Paeratakul, O., 1989. A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles. *Pharm. Res.*, 6, 413-417.
- Bodmeier, R., Wang, H., Herrman, J., 1994. Microencapsulation of chlorpheniramine maleate, a drug with intermediate solubility properties, by a non-aqueous solvent evaporation technique. *STP Pharma Sci.*, 4, 275-281.
- Bosquillon, C., Lombry, C., Préat, V., Vanbever, R., 2001. Influence of formulations excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance. *J. Control. Rel.*, 70, 329-339.
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997. Novel hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 63, 125-132.
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997a. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.*, 14, 1431-1436.
- Clark, A.R., Egan, M., 1994. Modelling the deposition of inhaled powdered drug aerosols. *J. Aerosol Sci.*, 25, 175-186.
- Edwards, D.A., Hanes, J., Caponetti, G., Hikach, J., Ben-Jebria, A., Eskew, M.L., Mintzes, J., Deaver, D., Lotan, N., Langer, R., 1997. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science*, 276, 1868-1871.
- Edwards, D.A., Ben-Jebria, A., Langer R., 1998. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J. Applied Physiol.*, 85, 379-385.
- El-Gibaly, I., 2002. Development and *in vitro* evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.*, 249, 7-21.
- Fernández-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1999. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.*, 16, 1576-1581.
- Genta, I., Pavanetto, F., Conti, B., Giunchedi, P., Conte, U., 1995. Improvement of dexamethasone dissolution rate from spray-dried chitosan microspheres. *STP Pharma Sci.*, 5, 202-207.
- Gerrity, T.R., Lee, P.S., Hass, F.J., Marinelli, A., Werner, P., Lourenco, R.V., 1979. Calculated deposition of inhaled particles in the airway generations of normal subjects. *J. Appl. Physiol.*, 47, 867-873.

- Ginani, T.M.F., Navarro, M.V., Do Nascimento, E.G., De Oliveira, U.O.B., 1999. The study of influence of crosslinking and organic additives on the behaviour of chitosan gels. *Química Nova*, 22, 801-804.
- Grenha, A., Seijo, B., Remuñán-López, C., 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 25, 427-437.
- Heyder, J., Armbruster, L., Gebhart, J., Grein, E., Stahlhofen, W., 1975. Total deposition of aerosol particles in the human respiratory tract for nose and mouth breathing. *J. Aerosol Sci.*, 6, 311-328.
- Hirano, S., Tsuchida, H., Nagao, N., 1989. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials*, 10, 574-576.
- Kawashima, Y., Handa, T., Kasai, A., Takenaka, H., Lin, S.Y., Ando, Y., 1985. Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium tripolyphosphate- chitosan. *J. Pharm. Sci.*, 74, 264-268.
- Khalid, M. N., Agnely, F., Yagoubi, N., Grossiord, J.L., Couarraze, G., 2002. Water state characterization, swelling behaviour, thermal and mechanical properties of chitosan based networks. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15, 425-432.
- Knapczyc, J., Krówczyński, L., Krzck, J., Brzeki, M., Nirnberg, E., Schenk, D., Strusczyk, H., 1989. Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical applications. In: Skak-Braek, B., Anthonsen, T., Sandford, P. (Ed.), *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, Elsevier, London, pp. 657-663.
- Kotze, A.F., de Leeuw, B.J., Lueßen, H.L., de Boer, A.G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., 1997. Chitosan for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.*, 159, 243-253.
- Kumbar, S.G., Kulkarni, A.R., Aminabhavi, T.M., 2002. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of cross-linking agent. *J. Microencapsul.*, 19, 173-180.
- Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Schacht, E.H., Junginger, H.E., 1992. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some natural polymers. *Int. J. Pharm.*, 78, 43-48.
- Lim, S.T., Forbes, B., Martin, G.P., Brown, M.B., 2001. In vivo and in vitro characterization of novel microparticulates based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS Pharm. Sci. Tech. (on line computer file)* 2, 4.
- Machida, Y.P., Sannon, T., Nagri, T., 1991. Preparation of microspheres containing fluorouracil using the «dry-in-oil» method and its release characteristics. *STP Pharma Sci.*, 1, 363-368.
- Mateovic, T., Kriznar, B., Bogata, J., Mrhar, A., 2002. The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres. *J. Microencapsul.*, 19, 29-36.
- Okamoto, H., Aoki, M., Danjo, K., 2000. A novel apparatus for rat in vivo evaluation of dry powder formulation for pulmonary administration. *J. Pharm. Sci.*, 89, 1028-1035.

Orienti, I., Cerchiara, T., Luppi, B., Bigucci, F., Zuccari, G., Zecchi, V., 2002. Influence of different chitosan salts on the release of sodium diclofenac in colon-specific delivery. *Int. J. Pharm.*, 238, 51-59.

Pavanetto, F., Perugini, P., Canti, B., Modena, T., Genta I., 1996. Evaluation of process parameters involved in chitosan microspheres preparation by the O/W/O multiple emulsion method. *J. Microencapsul.*, 13, 679-688.

Peppas, N.A., 1997. Hydrogels and drug delivery. *Colloid. Interface Sci.*, 2, 531-537.

Polson, A., 1950. Some aspects of diffusion in solution and a definition of a colloidal particle. *J. Phys. Colloid. Chem.*, 54, 649-652.

Portero, A., Remuñán-López, C., Nielsen, H.M., 2002. The potential of chitosan in enhancing peptide absorption across the TR146 cell culture model- an in vitro model of the buccal mucosa. *Pharm. Res.*, 19, 169-174.

Reithmeier, H., Herrman, J., Göpferich, A., 2001. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *J. Control. Rel.*, 73, 339-350.

Remuñán-López, C., Portero, A., Lemos, M., Vila-Jato, J.L., Núñez, M.J., Riveiro, P., Alonso, M.J., 2000. Chitosan microspheres for specific delivery of amoxicillin to the gastric cavity. *STP Pharm. Sci.*, 10, 69-76.

Schipper, N.G.M., Vårum, K.M., Artursson, P., 1996. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm. Res.*, 13, 1686-1692.

Schipper, N.G.M., Olsson, S., Hoogstraate, J.A., deBoer, A.G., Vårum, K.M., Artursson, P., 1997. Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res.*, 14, 923-929.

Shen, Z., Zhang, Q., Wei, S., Nagai T., 1999. Proteolytic enzymes as a limitation for pulmonary absorption of insulin: in vitro and in vivo investigations. *Int. J. Pharm.*, 192, 115-121.

Takeuchi, H., Yamamoto, H., Kawashima, Y., 2001. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47, 39-54.

Taylor, G., Kellaway, I., 2001. In: Hillery, M., Lloyd, A.W., Swerbrick, J., (Ed.), *Pulmonary drug delivery. Drug delivery and targeting for pharmacist and pharmaceutical scientists*, Taylor & Francis, London, pp. 269-300.

Tice, T.R., Gilley, R.M., 1985. Preparation of injectable controlled microcapsules by a solvent-evaporation process. *J. Control Release*, 2, 343-352.

Tokumitsu, H., Ichikawa, H., Saha, T.K., Fukumori, Y., Block, L.H., 2000. Design and preparation of gadolinium-loaded chitosan particles for cancer neutron capture therapy. *STP Pharma. Sci.*, 10, 39-49.

Tripathi, K., Singh, J., 1992. Aminophylline targeting to lung: optimization of the size and drug loading of albumin microspheres. *J. Microencapsulation*, 9, 229-235.

Wang, J.A, Ben-Jebria, A, Edwards, D.A., 1997. Controlled-release inhalation aerosols. In: Dalby, R.N., Byron, P.R., Farr, S.J., (Eds.), *Respiratory Drug Delivery*, vol.VI, IL:Interpharm, Buffalo Grove, pp.187-192.

Washington, N., Wilson, C.G., Washington, C., 1989. Pulmonary drug delivery. In: Washington, N., Wilson, C.G., Washington, C., (Eds.), *Physiological Pharmaceutics: Biological barriers to drug absorption*, Ellis Horwood Limited, Chichester, pp. 155-178.

Williams, R.O., Barron, M.K., Alonso, M.J., Remuñán-López, C., 1998. Investigation of a pMDI system containing chitosan microspheres and P134a. *Int. J. Pharm.*, 174, 209-222.

Yamamoto, H., Kuno, Y., Sugimoto, S., Takeuchi, H., Kawashima, Y., 2005. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J. Control. Rel.*, 102, 373-381.

***Parte I.3. Producción de microsferas lipídicas
mediante técnicas de emulsificación/evaporación del
disolvente***

Artículo 3

Development of lipid microspheres with aerodynamic properties suited for the pulmonary delivery of therapeutic proteins

D. Carrión-Recio, J.L. Vila-Jato and C. Remuñán-López*

*Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Santiago de
Compostela, Faculty of Pharmacy, Campus Sur, 15782-Santiago de Compostela,
Spain.*

* Corresponding author: Tel.: 00 34 981 563100 - ext. 15045

Fax: 00 34 981 547148

e-mail: ffcarelo@usc.es

Artículo sometido a evaluación por Journal of Pharmaceutical Sciences

ABSTRACT

Lipid microspheres with appropriate morphological and aerodynamic properties for pulmonary delivery were prepared by simple (O/W) and double water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) emulsion solvent evaporation techniques. The effect of several formulation variables (stirring rate, lipid concentration, emulsification rate, type of lipid and type of aqueous solvent) on the microspheres particle size and morphology was evaluated. As regards the effect of the stirring rate, large particles (inappropriate for lung deliver) of more than 30 μm were obtained when a vortex mixer was used to obtain the first and the second emulsions, whereas microspheres with small size ($< 5\mu\text{m}$) were produced using a homogenizer as emulsification system. The aerodynamic properties obtained using a TSI Aerosizer[®] LD have demonstrated the adequacy of the smaller microspheres to be delivered to the lungs. The suitability of the $W_1/O/W_2$ microparticles as protein carriers was investigated using fluorescein isothiocyanate-labeled bovine serum albumin (FITC-BSA) as model compound. The protein encapsulation efficiency was as high as 61.5% and its in vitro release was slow, with less than 30% of protein being released after 8 h.

INTRODUCTION

Significant advances in biotechnology have resulted in the production of a large number of therapeutic and antigenic proteins, which demand an adequate method for administration purposes. The efficacy of these active macromolecules given by the oral route is strongly hampered not only by their structural instability due to gastric pH, but also by the high metabolic intestinal and hepatic activity and the limited permeability of the mucosal barriers.^{1,2} As a consequence and due to their low half-lives, these macromolecules usually require frequent injections or continuous intravenous infusions,³ hence representing a serious inconvenience for the patients. The future of these macromolecules as therapeutic agents clearly depends on the investigation of other non-parenteral routes of administration and the design of appropriate vehicles for their delivery to the body.

The pulmonary route presents a number of potential advantages over the conventional gastrointestinal tract for the delivery of therapeutic macromolecules, including a large alveolar surface area, with an extensive blood supply, that is highly permeable to proteins and hence, adequate for their absorption.⁴ Furthermore, the compounds absorbed through the alveolar epithelium avoid the hepatic first pass metabolism.⁵ As a consequence, the pulmonary route offers a higher systemic bioavailability than other non-invasive routes.⁶ In fact, evidence of acceptable bioavailability following pulmonary administration has been reported for a number of proteins including γ -interferon, parathyroid hormone, calcitonin, insulin, recombinant human granulocyte colony stimulating factor and leuprolide.⁷⁻¹² The requisite for the reliable and specific delivery of macromolecules to the lung is the design of an adequate drug carrier system suited for this particular environment. In this respect, biodegradable microspheres, having favorable aerodynamic properties, are becoming increasingly attractive. Microspheres intended for lung deposition have been made of polyesters such as poly(lactic acid) (PLA) and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA).¹³⁻¹⁵ However, the use of synthetic polymer matrix materials for protein release application can entail detrimental effects on incorporated compounds. Peptide and protein drugs are

susceptible to various sources of inactivation during polymer erosion, which is related to the acidic microclimate and the accumulation of degradation products inside PLA and PLGA matrices.^{16,17} In contrast, the lipid materials such as phosphatidylcholine and dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)¹⁸⁻²⁰ have shown an interesting alternative to the above-mentioned polymeric materials. However, other excipients such as albumin,²⁰⁻²² lactose,^{19,22} polyols²¹ or even PLGA^{23,24} have been included in the lipid microspheres, making the production process much more complex.

Taking all these comments into account, our work focused on the production of microspheres made solely of biocompatible lipids such as triglycerides and cholesterol, possessing aerodynamic properties suitable for pulmonary delivery. Furthermore, our intention was to investigate the potential of the developed microspheres for the association and release of FITC-BSA as a model protein. For these purposes, a double (W₁/O/W₂) emulsion-solvent evaporation technique was developed.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The following chemicals were purchased from commercial suppliers and used as received: Glyceryl trimyristate (Dynasan[®] 114), Glyceryl tripalmitate (Dynasan[®] 116), Glyceryl tristearate, (Dynasan[®] 118) (Condea, Germany); cholesterol, fluorescein isothiocyanate labeled bovine serum albumin (FITC-BSA), polyvinyl alcohol (PVA) (Sigma Aldrich, Spain), chitosan glutamate (CS) (Mw = 300 kDa, deacetylation degree > 80%) (Pronova Lab., Norway) and methylene chloride (Romil, Spain). Ultrapure water [Milli-Q plus, Millipore Ibérica, Spain] was used throughout. All other chemical were reagent grade.

Preparation of microspheres

Microspheres were prepared by simple (O/W) and double ($W_1/O/W_2$) emulsion/solvent evaporation techniques. The methods proposed by Reithmeier H^{25,26} were adapted to produce microspheres of sizes smaller than 5 μm and, hence, suitable for lung deposition. Essentially, the more important modifications of the proposed methods were the increase of the stirring rate and the use of two different methods (implying different emulsification rates), as explained hereafter, to form the O/W and $W_1/O/W_2$ emulsions with the objective of obtaining smaller particle sizes.

Simple (O/W) emulsion/solvent evaporation method

A lipid solution in methylene chloride (2 ml) was emulsified into 6 ml of PVA 1% w/v to form an O/W emulsion. This O/W emulsion was then poured into a larger volume (300 ml) of ice-cooled aqueous phase (PVA 0.1% w/v) and stirred with a propeller stirrer (Janke & Kunkel Ika-Werk, Germany) for 1 hour to allow evaporation of the organic solvent. Finally, the microparticles were collected by vacuum filtration (membrane filters of 0.45 μm ; HNWP 47 mm, Millipore, U.S.A), rinsed with milli-Q water, freeze-dried (-30°C, 24 hr, Labconco apparatus, Labconco Corp., Kansas City, MI, USA) and stored in desiccators containing silica gel until their use.

The effect of different process variables on the particle size was investigated. Two different methods were used to obtain the O/W emulsion: the vortex mixer (2400 rpm, 10 sec., Heidolph REAX 2000, Germany) and the homogenizer (Heidolph DIAX 600; Germany). When the vortex mixer was used, the influence of the lipid concentration (75, 150, 300 mg/ml) and the stirring rate (750, 1000 rpm) were investigated while keeping the same lipid (Dynasan[®] 116). When the homogenizer was used, the concentration of 75 mg/ml of lipid was kept constant and the effect of lipid type (Dynasan[®] 114, Dynasan[®] 116, Dynasan[®] 118 and cholesterol) and emulsification rate (13500 rpm or 20500 rpm, 25 sec.) on the particle size were evaluated.

Double (W₁/O/W₂) emulsion/solvent evaporation method

The aqueous phase W₁ (125 µl of H₂O or chitosan (CS) solution 1% w/w in H₂O; 400 µl of PBS 7.4) was emulsified into the organic phase O (600 mg of Dynasan® 116 dissolved in 4 ml of methylene chloride, 150 mg/ml). The resulting W₁/O emulsion was then emulsified into a small volume (6 ml) of PVA 1% w/v to obtain the double emulsion W₁/O/W₂. This double emulsion was poured into a large volume (300 ml) of ice-cooled aqueous phase (PVA 0.1% w/v) and stirred with a propeller stirrer (750 rpm, Janke and Kunkel IKA-WERK, Germany) for 30 minutes. Finally, microparticles were isolated, rinsed, freeze-dried and stored as described above.

Once more, the effect of various process variables on the particle size was evaluated. Two methods were also used to obtain the W₁/O emulsion: the vortex mixer (2400 rpm, 10 sec.) and the sonicator (output 4, 10 sec., BransonSonifier® 250, United Kingdom). When the vortex mixer was used, the double emulsion W₁/O/W₂ was prepared also using this emulsification method. On the other hand, when the sonicator was used to obtain the W₁/O emulsion, the double emulsion W₁/O/W₂ was prepared using the Homogenizer (20500 rpm, 25 sec., Heidolf Diapix 600, Germany).

For the association of FITC-BSA to the microspheres, the protein (30 mg, 5% w/w of theoretical loading) was dissolved in 400 µl of PBS 7.4 to form the W₁ phase of the primary W₁/O emulsion. The protein solution was then emulsified in PVA 1% w/v using the sonicator and the homogenizer to obtain the W₁/O and the W₁/O/W₂ emulsions, respectively, as previously described. In order to minimize the loss of FITC-BSA towards the external aqueous phase (W₂), the pH of this phase (PVA 1% w/v and PVA 0.1% w/v) was previously adjusted with HCL 0.1N to the protein isoelectric point (4.6), in which the protein solubility is at its lowest.

Morphological characterization of the microspheres

Microspheres were placed onto metal plates, coated with gold palladium to achieve a film of 70 nm thickness (High Resolution Sputter Coater SC7640, Thermo VG Scientific, England) and viewed using a scanning electron microscope (SEM, JSM-6400, Tokyo, Japan).

Determination of real and apparent densities

Real densities of blank particles were determined by Helium pycnometry (Micropycnometer, Quanta Chrome, model MPY-2, U.S.A., n = 3). Their apparent tap densities were calculated by placing pre-weighed amounts of powder, corresponding to 2 ml of volume, into a graduated cylinder. After registering the initial volume, the cylinder was mechanically tapped (30 taps/min, Tecnociencia, Spain) and readings of volume were made until no further change of volume was observed.²⁷ The density was estimated as the mass divided by the volume (n = 3).

Determination of microspheres particle size

To estimate the particle size of microspheres, their Feret's diameters (the measured distance between parallel lines that are tangent to the particle profile and perpendicular to the ocular scale) were measured using an optical microscope (Olympus BH-2, Tokyo, Japan, n=100).

The experimental mean count (number) aerodynamic particle size was determined using a TSI Aerosizer® LD analyzer equipped with an Aerodisperser® (Amherst Process Instrument, Inc; Amherst, MA, U.S.A) whose measuring principle is based on direct time-of-flight measurements (n=3), according to the following equation:

$$C_d \frac{\pi d^2}{4} \rho_a \frac{(V_a - V_p)^2}{2} = 1/6 \pi d^3 \rho_p \frac{dV_p}{dt} \quad (1)$$

Where C_d : particle drag coefficient, d : particle geometric diameter, ρ_a : air density, ρ_p : particle density, V_a : air velocity and V_p : particle velocity.

For comparative purposes, the theoretical aerodynamic diameter (d_{aer}) of microspheres was calculated using the following formula:

$$d_{aer} = d * (\rho)^{1/2} \quad (2)$$

Where d is the Feret's particle diameter and ρ is the particle density which were obtained by optical microscopy and Helium pycnometry, respectively, as described before.

Encapsulation efficiency of microspheres

The drug content was calculated upon separation of microparticles from the formation aqueous medium by filtration (0.45 μm filters, low protein binding, Millex[®]-HV, Bedford, USA). The amount of free protein was measured in the supernatant by spectrophotometry (UV-1603, Shimadzu, Japan) at 494 nm. Determinations were carried out in triplicate.

The microparticles protein encapsulation efficiency (E.E.) was calculated as follows:

$$\text{E.E.(\%)} = [\text{Total protein amount} - \text{Free protein amount}] / \text{Total protein amount} \times 100$$

In vitro release studies

The in vitro release studies were performed by incubating 30 mg of the FITC-BSA loaded microspheres in 6 ml of pH 7.4 phosphate buffer (10 ml test tubes) under horizontal shaking (150 rpm, Heidolf Promax 2020, Germany) at 37°C. At predetermined times (1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hr) the microparticles dispersions were filtered (0.45 μm filters unit Millex[®]-HV, low protein binding, U.S.A.) and the supernatants were assayed for drug content by spectrophotometry

(UV-1603, Shimadzu, Japan) at 494 nm. Five replicates of each determination were carried out.

Statistical analysis

Mann-Whitney Rank Sum Test and Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (with the Pairwise Multiple Comparison Procedure Student-Newman-Keuls method) were employed to examine statistical significances between two or multiple groups, respectively (SigmaStat, Systat Software Inc. version 3.10). P values of < 0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

The goal of the present work was to prepare lipid microspheres suitable for pulmonary delivery of therapeutic proteins. Two techniques based on the formation of simple (O/W) and double ($W_1/O/W_2$) emulsions were developed. As mentioned before, the methods proposed by Reithmeier et al.^{25,26} were adapted to produce microspheres of sizes smaller than 5 μm and hence, suitable for lung deposition. It is well known that factors such as emulsification rate, viscosity of the inner phase, surfactant concentration and volume ratio of inner phase-to-external phase are key factors affecting size and morphology of the particles produced by emulsion solvent evaporation techniques.^{28,29} Therefore, in the first part of this work the influence of several formulation and process variables on the size and morphology of the lipid microspheres was investigated. In addition, the ability of these microspheres to associate and release the model therapeutic macromolecule FITC-BSA was evaluated.

Microspheres produced by simple (O/W) emulsion/solvent evaporation method

We first prepared microspheres using the simple (O/W) emulsion/solvent evaporation method. We evaluated, as indicated in the methodology section, the effect of the concentration and type of lipid, stirring rate and type of emulsification

system on the size of microparticles. The results depicted in Table 1, corresponding to the formulations prepared using the vortex emulsification system indicate that the particle size was not affected by the variation in the lipid O phase concentration from 300 to 150mg/ml, when 750 rpm was used as stirring rate ($P < 0.05$). However, using 1000 rpm, a decrease in the lipid concentration to 75 mg/ml produced significantly smaller microspheres compared to those obtained with 300 mg/ml ($P < 0.05$).

Table 1. Effect of stirring rate and lipid concentration on the particle size (Feret's diameter) of the microspheres obtained by the simple O/W emulsion technique using the vortex emulsification system (lipid = Dynasan® 116; mean \pm SD; n = 100)

Stirring rate (rpm)	Lipid concentration (mg/ml)	Particle size (μm)
750	150	39.20 \pm 9.89
750	300	39.45 \pm 10.85
1000	75	33.20 \pm 7.70
1000	300	42.80 \pm 12.05

In a well-mixed two-phase emulsion system, the droplets collide with each other, coalesce, and re-divide continuously, and highly viscous droplets tend to coalesce more readily than they can re-divide.³⁰ Theoretically, a decrease in the lipid content should lead to a decrease in the viscosity of the inner phase, so inducing a lower coalescence of the emulsion droplets and, hence, generating smaller particles. It is likely that the lowest concentration of 75 mg/ml has a viscosity low enough to generate particles smaller than those obtained with the other two concentrations of lipid.

Particle size of microspheres prepared using 300 mg/ml of lipid concentration was not affected by the stirring rate either (Table 1, $P < 0.05$). It has been extensively reported that an increase in the stirring rate produces finer

droplets, and consequently, smaller microspheres.³¹⁻³³ However, in our case, the emulsion was obtained by mixing the inner organic phase with a small volume of the aqueous external phase and then, it was poured into a large volume of ice-cooled external phase and stirred (750, 1000 rpm) until particles formation. Since the evaporation of methylene chloride was very fast and the temperature of the external phase was low, the solidification of the lipid started immediately. Consequently, only the size of the emulsion droplets obtained by the vortex mixer (before putting them into the ice-cooled external phase) and not the stirring rate determined the size of the final microspheres. This would explain why both of the stirring rates used in this study, produced microspheres with similar particles sizes. Furthermore, the SEM micrographs depicted in Figure 1 reveal that the particles corresponding to the different formulations had a similar external porous appearance, irrespective of the stirring rate and the lipid concentration.

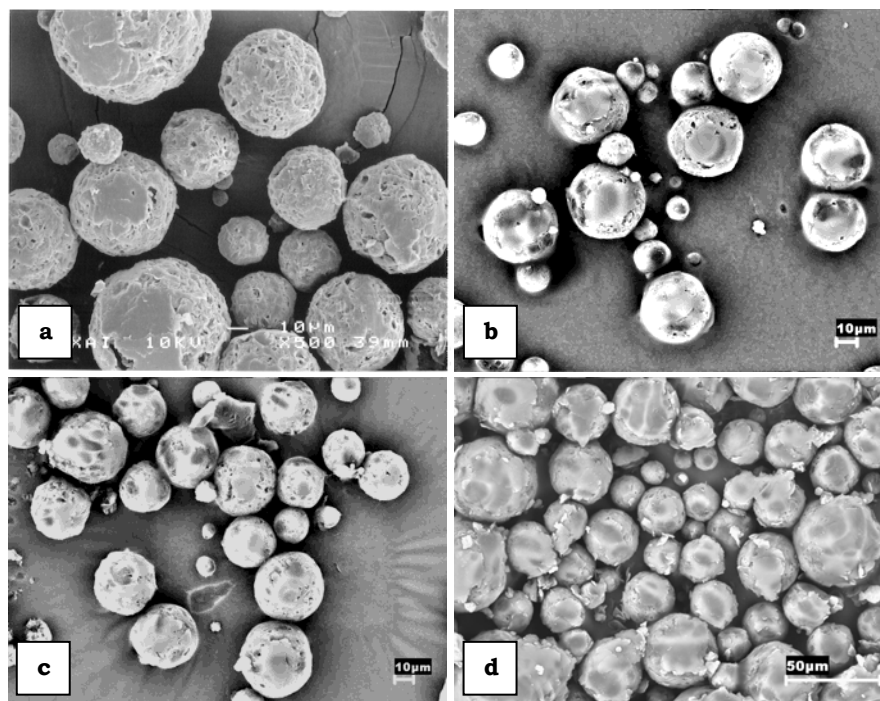


Figure 1. SEM microphotograph of microspheres prepared by the simple O/W emulsion technique using the vortex emulsification system and different lipid (Dynasan® 116) amounts and stirring rates: (a) 600 mg of lipid, 750 rpm; (b) 300 mg of lipid, 750 rpm; (c) 600 mg of lipid, 1000 rpm; (d) 150 mg of lipid, 1000 rpm.

The high surface porosity could be explained by the extremely fast lipid solidification. Once the polymer has precipitated at the droplet surface, the organic solvent still present in the microspheres will diffuse through the lipid into the aqueous phase (opening pores in the microspheres) and porous microspheres will therefore be obtained.³⁴

Since the vortex mixer emulsification method produced, in all the assayed conditions, particles with sizes of approximately 33-43 μm , which are too large for lung deposition, we decided to change the vortex emulsification system for the homogenizer, which can generate substantially higher rates. In fact, this emulsification system allowed us to obtain particles with significantly smaller sizes ($\approx 2.58 \mu\text{m}$ to $3.3 \mu\text{m}$) ($P < 0.05$, Table 2).

Table 2. Effect of emulsification rate and type of lipid on the particle size (Feret's diameter) of the microspheres obtained by the simple O/W emulsion technique using the homogenizer emulsification system (lipid amount = 150 mg; stirring rate = 1000 rpm; mean \pm SD; n = 100)

Emulsification rate (rpm)	Lipid	Particle size (μm)
13500	Dynasan® 118	3.17 \pm 1.14
13500	Cholesterol	3.30 \pm 1.36
20500	Dynasan® 116	3.08 \pm 1.07
20500	Dynasan® 114	3.09 \pm 0.94
20500	Dynasan® 118	2.72 \pm 0.99
20500	Cholesterol	2.58 \pm 0.86

Moreover, we found that the emulsification rate of 20500 rpm produced significantly smaller cholesterol and Dynasan® 118 particles compared to those obtained using 13500 rpm ($P < 0.05$). In addition, using the emulsification rate of

20500 rpm, the lipids Dynasan® 114 and 116 produced particles larger than those obtained using Dynasan® 118 and cholesterol (Table 2, $P < 0.05$) presumably due to differences in the viscosity of their organic solutions. However, the micrographs depicted in Figure 2 reveal that the surface appearance of the microspheres was not affected by the type of lipid.

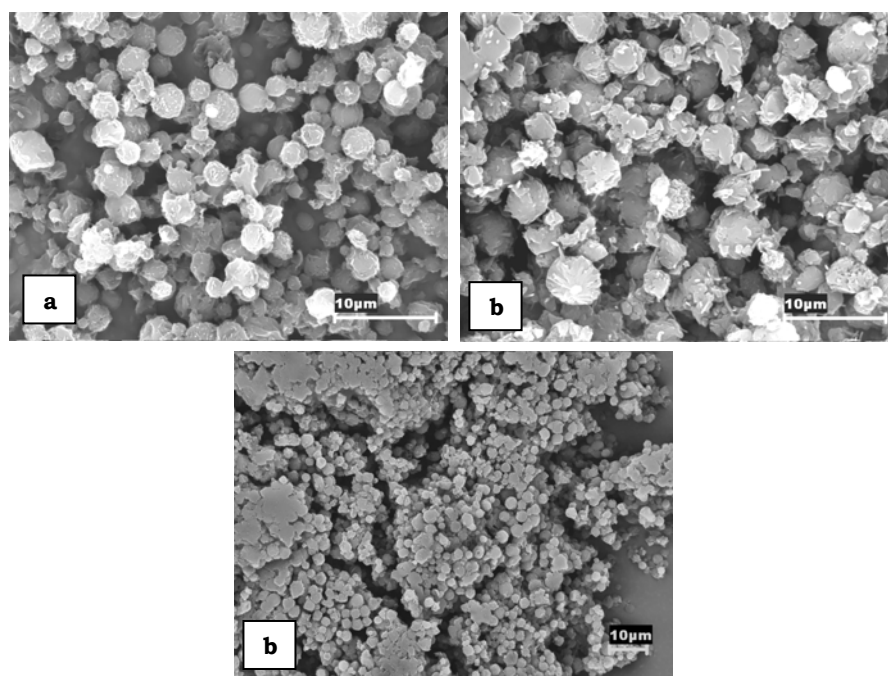


Figure 2. SEM microphotograph of microspheres prepared by the simple O/W emulsion technique using the homogenizer emulsification system and different emulsifications rates and lipids: (a) 13500 rpm, Dynasan® 118; (b) 13500 rpm, cholesterol; (c) 20500 rpm; Dynasan® 116 (stirring rate = 1000 rpm)

Microspheres produced by double (W₁/O/W₂) emulsion/solvent evaporation method

In this study, we also employed a double emulsion water-in-oil-in-water (W₁/O/W₂)/solvent evaporation technique for the purpose of promoting the formation of hollow structures or increasing the porosity of the particles surface and, hence, reducing their density. It was expected that when the organic solvent

started to evaporate and the lipid to solidify, the aqueous internal solvent would also diffuse into the external phase causing the formation of highly porous structures.³⁵ Furthermore, the inclusion of an aqueous inner phase would facilitate the encapsulation of the hydrophilic proteins.

In this double emulsion method, two different emulsification systems were also used. Once again, a great reduction in particle size of microspheres prepared by sonication and homogenization (for the first and second emulsifications, respectively) with respect to those obtained by vortex mixing (for both emulsions) was observed (compare Tables 3 and 4).

Table 3. Effect of type of W₁ aqueous phase solvent on the particle size (Feret's diameter) of the microspheres obtained by the double W₁/O/W₂ emulsion technique using the vortex emulsification system (lipid = Dynasan® 116, 600 mg; stirring rate = 750 rpm; mean ± SD; n = 100)

Aqueous solvent (W ₁)	Particle size (µm)
H ₂ O	44.8 ± 17.37
Chitosan*	37.1 ± 14.68

* 1% (w/w) chitosan solution in water

Table 4. Effect of type of W₁ aqueous phase solvent on the particle size (Feret's diameter) of the microspheres obtained by the double W₁/O/W₂ emulsion technique using the sonicator/homogenizer emulsification system (emulsification rate = 20500 rpm; lipid = Dynasan® 116; 600 mg; stirring rate = 750 rpm; mean ± SD; n = 100)

Aqueous solvent (W ₁)	Particle size (µm)
H ₂ O ^a	2.77 ± 1.63
Chitosan ^{a,*}	2.96 ± 1.37
PBS 7.4 ^b	3.01 ± 0.98

^a W₁ = 125 µl, ^b W₂ = 400 µl, * 1% (w/w) chitosan solution in water

Two formulations which differ in the inner aqueous phase (H_2O , chitosan solution 1% w/w in H_2O) were prepared using the vortex mixer (Table 3). The aim of including the polymer solution (chitosan) was to investigate a new alternative to change microspheres characteristics (increase microspheres porosity).³⁶ However, similar external porous appearances and hollow structures were obtained (Figure 3), although the particles significantly differed in their size ($P < 0.05$) (Table 3).

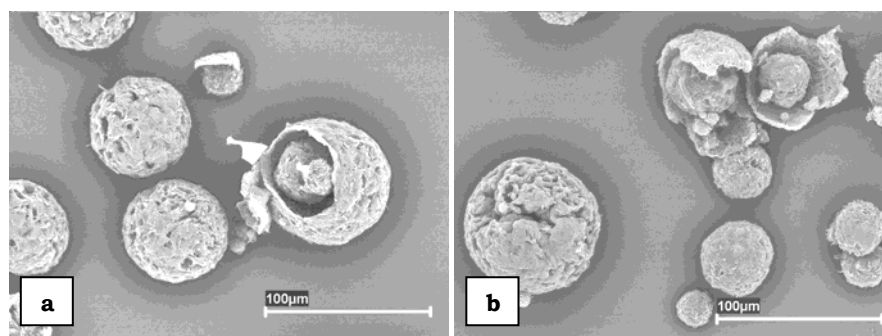


Figure 3. SEM microphotograph of microspheres obtained by the double $W_1/O/W_2$ emulsion technique using the vortex emulsification system and different W_1 phases: (a) H_2O ; (b) CS solution (1% w/w) (lipid = Dynasan® 116; stirring rate = 750 rpm).

Only those particles obtained by sonication followed by homogenization were small enough to be delivered to the lungs (Table 4). For this emulsification system, three aqueous solvents (H_2O , chitosan 1%w/w and phosphate buffer saline (PBS pH = 7.4) were selected. Small particles (below 5 μm) with similar sizes ($P < 0.05$) and morphologies were obtained in all cases (Table 4, Figures 4 and 5), with hollow particles being also visible (see Figure 5).

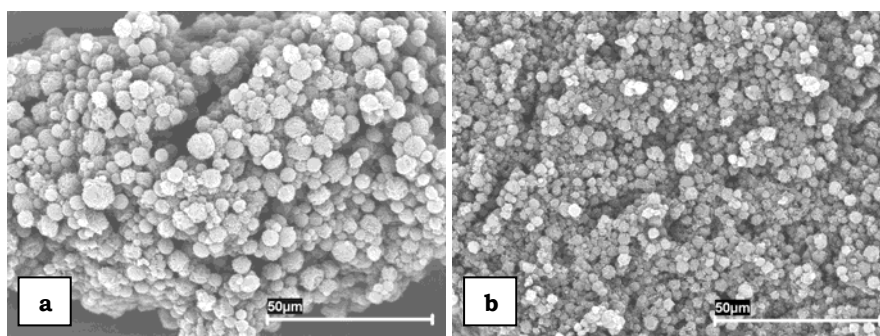


Figure 4. SEM microphotograph of microspheres prepared by the double $W_1/O/W_2$ emulsion technique using the sonicator/homogenizer emulsification system and different W phases: (a) H_2O ; (b) CS solution (1% w/w) (lipid = Dynasan® 116; emulsification rate = 20500 rpm; stirring rate = 750 rpm).

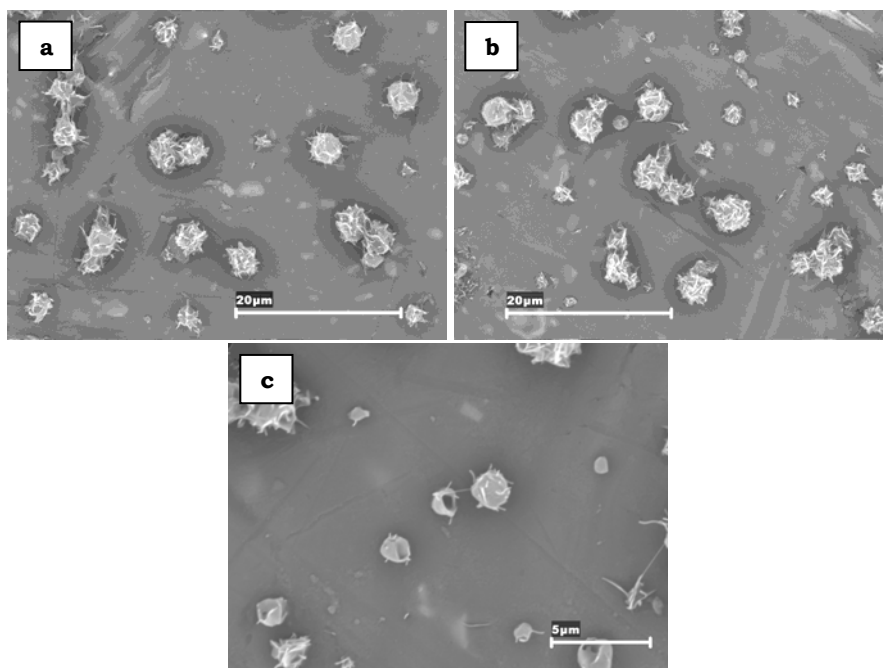


Figure 5. SEM microphotograph of microspheres prepared by the double $W_1/O/W_2$ emulsion technique using the sonicator/homogenizer emulsification system and different W phases: (a) PBS 7.4; (b, c) solution of FITC-BSA in PBS 7.4 (lipid = Dynasan® 116; emulsification rate = 20500 rpm; stirring rate = 750 rpm).

With respect to the flow powder characteristics, it is important to remark that the microparticles obtained using homogenization (O/W method) or sonication followed by homogenization (W₁/O/W₂ technique) display, as expected due to their small size, a higher tendency to aggregate. The microspheres obtained by the O/W emulsification method using Dynasan[®] 114, show some deformation of their spherical structure and lose their original form due to the simple manipulation of the powder. Consequently, SEM microphotographs were difficult to obtain.

Aerodynamic properties of microspheres

When developing pulmonary particulate systems, the particle size distribution has to be well characterized.³⁷ For the assessment of the aerosol particle size distribution from drug delivery devices, compendial methods emphasize the use of the cascade impactor or multistage liquid impinger.^{38,39} These methods, if carried out correctly, provide unambiguous mass-weighted data that are traceable via the chosen assay technique directly to the drug substance present,⁴⁰ but they are time consuming. In contrast, the new time-of-flight techniques (TOF) such as the Aerosizer[®] family of particle size analyzers offer a distinct advantage in terms of easy use combined with shorter measurement times.

In this work, Aerosizer[®] equipped with an Aerodisperser[®] was used to study the aerodynamic properties of some of the blank formulations of less than 5 μm in particle size. Their values of real and apparent tap densities as well as theoretical (d_{acr}) and mean count (number) experimental aerodynamic diameters (NAD), are shown in Tables 5 and 6.

Table 5. Densities and aerodynamic diameters of the microspheres obtained by the simple O/W emulsion technique using the homogenizer emulsification system (emulsification rate: 20500 rpm, lipid amount = 150 mg; stirring rate = 1000 rpm; mean \pm SD; n = 100)

Lipid type	ρ_r (g/cm ³)	ρ_t (g/cm ³)	d_{aer} (μ m)	NAD (μ m)
Dynasan® 116	0.958 \pm 0.037	0.352 \pm 0.005	2.77 \pm 1.09	2.60 \pm 2.28
Dynasan® 118	1.028 \pm 0.038	0.266 \pm 0.002	2.56 \pm 1.09	1.79 \pm 2.20

ρ_r = real density; ρ_t = tap density; d_{aer} = theoretical aerodynamic diameter; NAD = mean count (number) aerodynamic diameter

Table 6. Densities and aerodynamic diameters of the microspheres obtained by the double W₁/O/W₂ emulsion technique using the sonicator/homogenizer emulsification system (emulsification rate = 20500 rpm; lipid = Dynasan® 116, 600 mg; stirring rate = 750 rpm; mean \pm SD; n = 100)

Aqueous solvent	ρ_r (g/cm ³)	ρ_t (g/cm ³)	d_{aer} (μ m)	NAD (μ m)
H ₂ O ¹	1.043 \pm 0.018	0.353 \pm 0.010	2.32 \pm 1.23	3.19 \pm 1.86
Chitosan* ¹	1.013 \pm 0.040	0.341 \pm 0.002	2.57 \pm 1.15	3.10 \pm 2.17
PBS 7.4 ²	1.040 \pm 0.006	0.349 \pm 0.002	2.85 \pm 1.06	2.80 \pm 2.36

ρ_r = real density; ρ_t = tap density; d_{aer} = theoretical aerodynamic diameter; NAD = mean count (number) aerodynamic diameter; * 1% (w/w) chitosan solution in water; ¹ W₁ = 125 μ l, ² W₁ = 400 μ l

The real density values, used in the calculation of aerodynamic diameters, were similar for all the formulations studied (0.958-1.04 g/cm³). Furthermore, tap densities, with values smaller than 0.36 g/cm³, were considered adequate to reach the alveolar region. Taking into account that maximal deposition of particles in the alveolar region occurs for aerodynamic diameters between 1 and 5 μ m, all these microspheres, being in the appropriate range of size, should successfully reach the alveolus.

Association and “in vitro” release of FITC-BSA from the microparticles

As it was previously stated, the suitability of the lipid microspheres prepared by the $W_1/O/W_2$ technique as protein carriers was investigated using FITC-BSA as protein model and Dynasan 116[®] as lipid material. The solvent selected to dissolve the FITC-BSA prior to its encapsulation was the PBS 7.4, which produced FITC-BSA loaded microspheres with similar appearance (Figure 5) and particle size ($2.79 \pm 1.08 \mu\text{m}$) to that of the corresponding non-loaded ones. It was desirable to produce microparticles with a high drug loading to reduce the quantity of microspheres to be inhaled as much as possible. The $W_1/O/W_2$ technique allowed us to introduce the protein solution in PBS 7.4 as the W_1 phase, yielding an encapsulation efficiency of $61.56 \pm 1.36\%$. Double $W_1/O/W_2$ emulsions were expected to result in low protein entrapment levels due to the partition of the hydrophilic drug specie into the continuous aqueous phase.⁴¹ As explained in the methodology section, in order to minimize the loss of FITC-BSA towards the external aqueous phase, the pH of this phase was adjusted to the isoelectric point of the protein (5.3). On the other hand, the stability of the primary W/O emulsion is a prerequisite for the successful stabilization of a multiple emulsion and the loading of a large amount of drug within the solid microparticles.³⁵ Although in our case the stability of the W/O emulsion was greatly improved using sonication compared to the vortex system, there does exist a certain tendency of the aqueous phase to coalesce rapidly enabling the escape of some protein to the external phase, which might explain the lack of total protein encapsulation.

The in vitro release pattern of the FITC-BSA loaded microspheres is displayed in Figure 6.

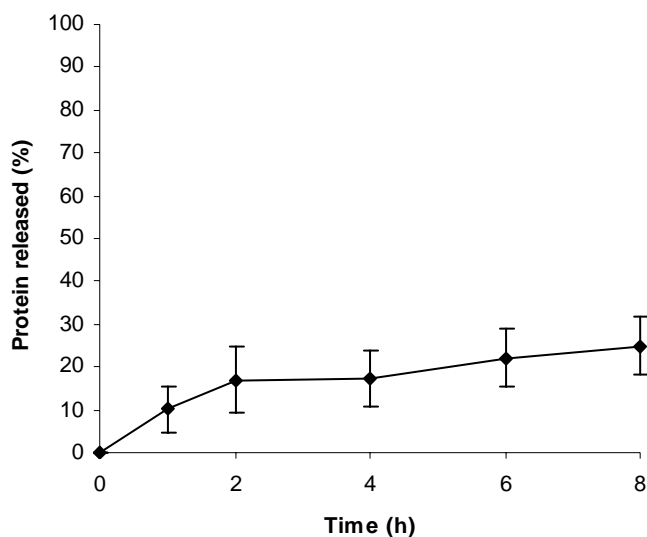


Figure 6. *In vitro* release of FITC-BSA from microspheres obtained by double $W_1/O/W_2$ emulsion technique using the sonicator/homogenizer emulsification system (lipid = Dynasan[®] 116; emulsification rate: 20500 rpm, stirring rate = 750 rpm; n = 5).

As can be seen, without detecting any burst effect only 20% of protein was released after 8 h. This slow release profile could be explained by the adsorption of the proteins to the matrix material of microparticles, which has already been described as a critical factor in controlling peptide and protein release kinetic.⁴²

CONCLUSIONS

Microspheres with morphological properties and aerodynamic size range suitable for pulmonary delivery, using solely lipids, were prepared by simple and double emulsion solvent evaporation techniques. These microspheres show high protein encapsulation efficiency and sustained release profile. Taking into account that aerosol mass deposition in the respiratory tract is related to particle aerodynamic diameter, a number of these formulations are expected to deposit and release the drug in the alveolar region following their pulmonary administration.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Spanish Government (CICYT, SAF 2002-03314) and the Xunta de Galicia (PGIDT00PXI20315PR). The grants to D. Carrión from Agencia Española de Cooperación Internacional and by the USC are appreciated.

REFERENCES

1. Lipka E, Crison J, Amidon GL. 1996. Transmembrane transport of peptide type compounds: prospects for oral delivery. *J Control Rel* 39:121-9.
2. Borchard G, Lueßen HL, de Boer AG, Verhoef J. C, Lehr CM, Junginger HE. 1996. The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: Effects of chitosan-glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro. *J Control Rel* 39:131-138.
3. Putney SD, Burke PA. 1998. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nat Biotechno* 16:153-7.
4. Shen Z, Zhang Q, Wei S, Nagai T. 1998. Proteolytic enzymes as a limitation for pulmonary absorption of insulin: in vitro and in vivo investigations. *Int J Pharm* 192:115-21.
5. Yang X, Ma JKA, Malanga CJ, Rojanasakul Y. 2000. Characterization of proteolytic activities of pulmonary alveolar epithelium. *Int J Pharm* 195:93-101.
6. Mitra R, Pezron I, Yuping L, Mitra AK. 2001. Enhanced pulmonary delivery of insulin by lung lavage fluid and phospholipids. *Int J Pharm* 217:25-31.
7. Patton JS, Trincherro P, Platz RM. 1994. Bioavailability of pulmonary delivery of peptides and proteins: g-interferon, calcitotins and parathyroid hormones. *J Control Rel* 28:79-85.
8. Colthorpe P, Farr SF, Taylor G, Smith IJ, Wyatt D. 1992. The pharmacokinetics of pulmonary delivery insulin: a comparison of intratracheal and aerosol administration to the rabbit. *Pharm Res* 9:764-8.
9. Patton JS, Platz RM. 1992. Routes of delivery: case studies. 2. Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Adv Drug Delivery Rev* 8:179-96.
10. Niven RW, Lott FD, Cribbs JM. 1993. Pulmonary absorption of recombinant methionyl human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) after intratracheal instillation to the hamster. *Pharm Res* 10:1604-10.

11. Niven RW, Lott FD, Ip AY, Cribbs JM. 1993. Pulmonary delivery of powder and solutions containing granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) to the rabbit. *Pharm Res* 11:1101-09.
12. Adjei AL, Garren J. 1990. Pulmonary delivery of peptide drugs: effect of particles size on bioavailability of leuprolide acetate in healthy male volunteers. *Pharm Res* 7:565-9.
13. Armstrong DJ, Elliott NC, Ford JI, Gadsdon D, McCarthy GP, Rostron C, Warsley MD. 1996. Poly-(D,L-Lactic Acid) microspheres incorporating histological dyes for intra-pulmonary histopathological investigations. *J Pharm Pharmacol* 48:258-62.
14. El-Baseir MM, Phipps MA, Kellaway IW. 1997. Preparation and subsequent degradation of poly(l-lactic acid) microspheres suitable for aerolisation: a physico-chemical study. *Int J Pharm* 151:145-53.
15. Vinod AP, Mehta RC, Deluca PP. 1997. In vitro and in vivo respirable fractions of isopropanol treated PLGA microspheres using dry powder inhaler. *Int J Pharm* 151:175-82.
16. Schwendeman SP, Cardamone M, Klivanov A, Langer R, Brandon MR. 1996. Stability of proteins and their delivery from degradable polymer microspheres. *Drugs Pharm Sci* 77:1-49.
17. Shenderova A, Burke TG, Schwendeman SP. 1999. The acidic microclimate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins. *Pharm Res* 16:241-248.
18. Evora C, Soriano I, Rogers RA, Shakesheff KM, Hanes J, Langer R. 1998. Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Control Rel* 51:143-52.
19. Vanbever R, Mintzes JD, Wang J, Nice J, Chen D, Batycky R, Langer R, Edwards DA. 1999. Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation. *Pharm. Res* 17:1735-42.
20. Ben-Jebria A, Chen D, Eskew M, Vanbever R, Langer R, Edwards DA. 1999. Large porous particles for sustained protection from carbacol-induced bronchoconstriction in guinea pigs. *Pharm Res* 16:555-561.
21. Bosquillón C, Lombry C, Préat V, Vanbever R. 2001. Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance. *J Control Rel* 70:329-39.
22. Lombry C, Bosquillón C, Préat V, Vanbever R. 2002. Confocal imaging of rats lungs following intratracheal delivery of dry powders or solutions of fluorescent probes. *J Control Rel* 83:331-41.
23. Vinod AP, Mehta RC, Deluca PP. 1997. In vitro and in vivo respirable fractions of isopropanol treated PLGA microspheres using dry powder inhaler. *Int J Pharm* 151:175-82.

24. Edwards DA, Hanes J, Caponetti G, Hrkarch J, Ben-Jebria A, Eskew ML, Mintzes J, Deaver D, Lotan N, Langer R. 1997. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science* 276:1868-71.
25. Reithmeier H, Herrman J, Göpferich A. 2001. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *J Control Rel* 73:339-350.
26. Reithmeier H, Herrman J, Göpferich A. 2001. Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostine. *Int J Pharm* 218:133-43.
27. El-Gibaly I. 2002. Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. *Int J Pharm* 249:7-21.
28. Yan N, Zhang M, Ni P. 1994. Study on polyamide microcapsules containing oily liquids. *J Microencapsul* 43:1569-73.
29. Maa Y, Hsu C. 1996. Liquid-liquid emulsification by static mixer for use in microencapsulation. *J Microencapsul* 13:419-33.
30. Arshady R. 1991. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polyactides and related polyesters. *J Control Rel* 17:1-22.
31. Gabor F, Ertl B, Wirth M, Mallinger R. 1999. Ketoprofen-poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: influence of manufacturing parameters and the type of polymer on the release characteristics. *J Microencapsul* 16:1-12.
32. Chen W, Lu DR. 1999. Carboplatin-loaded PLGA microspheres for intracerebral injection: formulation and characterization. *J Microencapsul* 16:551-63.
33. Sandrap P, Moës AJ. 1993. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Int J Pharm* 98:157-64.
34. Bodmeier R, Cheng H, Tyle P, Jarosz P. 1991. Pseudoephedrine HCL microspheres formulated into an oral suspension dosage forms. *J Control Rel* 15:65-77.
35. Nihant N, Schugens C, Grandles C, Jerome R, Teyssie P. 1994. Polylactide microparticles prepared by double emulsion/evaporation technique. I. Effect of primary emulsion stability. *Pharm Res* 11:1479-84.
36. Remuñán-López C, Lorenzo-Lamosa ML, Vila-Jato JL, Alonso MJ. 1998. Development of new chitosan-cellulose multicore microparticles for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 45:49-56.
37. Taylor G, Kellaway I. 2001. Pulmonary drug delivery. In: Hillery M, Lloyd AW, Swerbrick J, editors. *Drug delivery and targeting for pharmacist and pharmaceutical scientists*, London, Taylor & Francis. pp 269-300.
38. United States Pharmacopeia. 2000. Physical test and determinations: Aerosols, metered dose inhalers and dry powder inhalers. *United States Pharmacopeia*. 1895-1912.

39. European pharmacopoeia. 1980. Preparation for inhalation: aerodynamic assessment of fine particles. Moulin-lès-Metz. Maisonneuve. France.
40. Mitchell JP, Nagel MW. 1999. Time-of-flight aerodynamic particle size analysers: their use and limitations for the evaluation of medical aerosols. *J Aerosol Med* 12: 217-40.
41. Chen JL, Chiang CH, Yeh MK. 2002. The mechanism of PLA microparticle formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method. *J Microencapsul* 19:333-46.
42. Crotts G, Sah H, Park TG. 1997. Adsorption determines in vitro release rate from biodegradable microparticles: quantitative analysis of surface area during degradation. *J Control Rel* 47:101-111.

Parte II. Evaluación *in vivo* de las microsferas de quitosano destinadas a la administración pulmonar de péptidos y proteínas

Parte II.1. Estudios preliminares a la evaluación in vivo de las microsferas de quitosano conteniendo insulina: identificación de las condiciones óptimas para la realización de los estudios en ratas

PARTE II.1

Estudios preliminares a la evaluación in vivo de las microsferas de quitosano conteniendo insulina: identificación de las condiciones óptimas para la realización de los estudios en ratas

En este apartado se describen los estudios preliminares que se realizaron para establecer las condiciones más adecuadas para la administración *in vivo* de las microsferas conteniendo insulina, estudio que se recoge en la **Parte II.3 (Art. 4)** de esta memoria. De acuerdo con la bibliografía consultada, para la realización de estudios de administración pulmonar de formulaciones en animales de experimentación, la mayoría de los autores utiliza la vía intratraqueal. Nosotros hemos seleccionado este método tanto para la investigación de la distribución *in vivo* de las microsferas de CS conteniendo FITC-BSA, como para la evaluación del efecto hipoglucémico tras la administración de las microsferas de CS conteniendo insulina. En este último caso, la disminución de los niveles de glucosa se consideró como indicador de la eficacia de las formulaciones. En consecuencia, se hizo imprescindible conocer y/o eliminar aquellas variables, diferentes de la propia formulación, que podrían contribuir a su efecto hipoglucémico y, por ende, llevar a conclusiones erróneas. Así, nos propusimos los objetivos que se recogen a continuación.

OBJETIVOS:

Los principales objetivos de este estudio preliminar fueron:

- Evaluar el efecto que, sobre los niveles de glucosa en suero, pudieran tener variables tales como: el ayuno en ratas anestesiadas, el libre acceso de las ratas a los alimentos durante la realización del estudio y la administración intratraqueal de una solución de tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4.
- Identificar las condiciones óptimas para la administración por vía intratraqueal de las formulaciones conteniendo insulina, que son objeto del estudio que se recoge en la **Parte II.3 (Art. 4)**.

PARTE EXPERIMENTAL:

Se utilizaron como animales de experimentación ratas *Sprague-Dawley* macho, no diabéticas, con pesos comprendidos entre 250 y 300 g. Se determinaron los niveles basales de glucosa sérica de las ratas en condiciones normales. Se cuantificaron los niveles de glucosa sérica a tiempo 0 de ratas anestesiadas y sometidas o no a ayuno durante la noche anterior (12 horas) a la determinación. Además, se determinó la evolución de los niveles de glucosa sérica en ratas anestesiadas, no sometidas a ayuno la noche anterior y con libre acceso a alimentos durante la realización del estudio. Finalmente se cuantificaron los niveles de glucosa tras la administración intratraqueal de una solución de PBS (tampón fosfato sódico) pH 7.4, en presencia o ausencia de alimentos durante la realización del estudio en ratas no sometidas a ayuno durante la noche anterior al experimento. En este último caso se procedió de la siguiente manera: Los animales fueron anestesiados utilizando pentobarbital sódico (Sigma Aldrich, España) por inyección intraperitoneal (53 mg/kg) y colocados con la parte ventral hacia arriba, sobre una tabla quirúrgica. Luego, se procedió a la exposición de la tráquea a través de una incisión longitudinal en el cuello del animal utilizando tijeras quirúrgicas. Se insertó una cánula (endovenosa, *Johnson & Johnson Medical*, España) entre los anillos quinto y sexto de la tráquea hasta una profundidad de 12-15 mm y se administró la solución (90 μ l) a través de la cánula (**Figura 1**). A continuación, la cánula se retiró de la tráquea y se suturó la piel del cuello de la rata (suturas quirúrgicas, *Johnson & Johnson Medical*, España). Los animales se recuperaron de la anestesia al cabo de 1 o 2 horas.

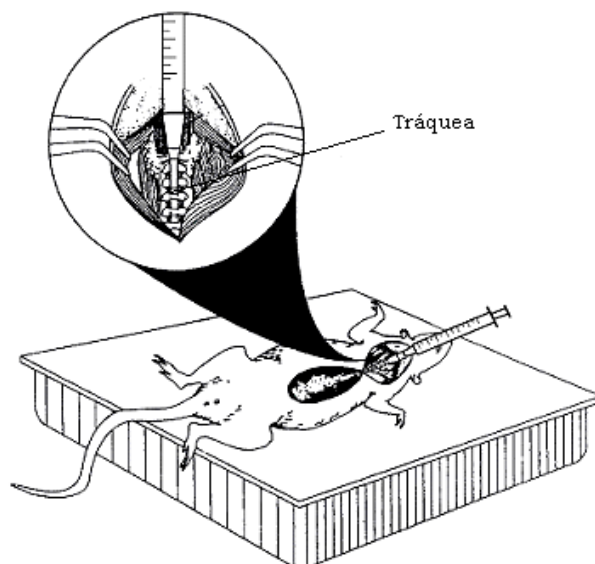


Figura 1. Esquema del procedimiento de administración de la solución de PBS pH 7.4 por instilación intratraqueal.

La determinación de los niveles de glucosa sérica se efectuó mediante extracción de muestras de sangre (150-200 μ l) a tiempos preestablecidos (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 480 minutos) de la vena de la cola de la rata. Las muestras fueron centrifugadas (*Sigma 2-15*, Alemania) a 3500 rpm durante 5 minutos y los niveles de glucosa sérica fueron medidos utilizando el método enzimático-colorimétrico de glucosa (*GOD-PAP*, *SPINREACT*; 505 nm, *UV-1603*, Shimadzu, Japón).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Obtención de la curva de niveles basales de glucosa sérica:

Antes de proceder a la evaluación de las distintas variables previamente indicadas, se obtuvieron las curvas de niveles basales de glucosa sérica de ratas en condiciones normales, es decir no anestesiadas y sin ser sometidas a ayunas durante la noche previa al comienzo del estudio, y sin tener libre acceso a los alimentos durante la realización del mismo. Los resultados obtenidos, que se

muestran en la **Figura 2**, indican que los niveles de glucosa fluctúan un 25% durante todo el tiempo que dura el estudio, lo cual se podría explicar por los mecanismos fisiológicos destinados a la estabilización de los niveles de glucosa en el organismo.

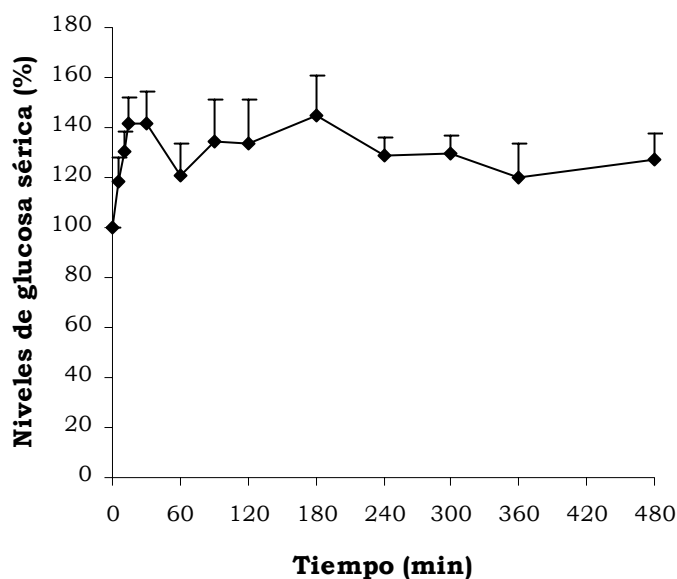


Figura 2. Niveles de glucosa sérica de las ratas en condiciones de no ayuno y no anestesia y sin acceso a alimentos durante la realización del estudio (n=4).

Efecto del ayuno sobre los niveles iniciales de glucosa sérica en ratas anestesiadas:

En la literatura consultada hemos encontrado discrepancias en cuanto a la conveniencia de someter o no a los animales de experimentación a un régimen de ayuno durante la noche anterior a la realización del estudio (Okumura y col., 1992; Edwards y col., 1997; Mitra y col., 2001; Todo y col., 2001). Debido a que para proceder a la administración intratraqueal de formulaciones es indispensable anestesiarse a los animales, decidimos evaluar el efecto del ayuno durante 12 horas previas al estudio, sobre los niveles iniciales ($t = 0$) de glucosa sérica de ratas anestesiadas. Los animales, a los que se les permitió en todo momento libre acceso al agua, fueron anestesiados por administración intraperitoneal de 53.3 mg/kg de

pentobarbital, dosis que permitió la correcta manipulación de los mismos al cabo de 10 minutos aproximadamente y su recuperación al cabo de 1-2 horas.

Como se puede observar en la **Figura 3**, los niveles de glucosa disminuyeron en un 50%, en aquellas ratas anestesiadas que habían sido sometidas a ayuno, con respecto a las que no se habían mantenido en ayunas.

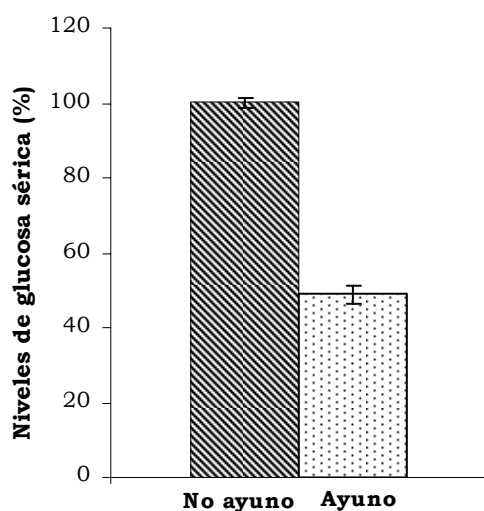


Figura 3. Niveles de glucosa sérica a iniciales (a tiempo 0) de ratas anestesiadas en ayuno y no ayuno durante 12 horas ($n \geq 8$).

Teniendo en cuenta que se esperaba la aparición de marcados efectos hipoglucémicos tras la administración de las formulaciones conteniendo insulina y que habíamos comprobado que el ayuno podría incrementar dichos efectos e, incluso, provocar la muerte de los animales de experimentación, decidimos permitir su libre acceso a los alimentos durante la noche previa al estudio.

Evolución de los niveles de glucosa sérica en ratas anestesiadas, no mantenidas en ayuno previo y con libre acceso a los alimentos durante el ensayo:

Se determinó la evolución de los niveles de glucosa durante 8 horas en ratas anestesiadas, que tuvieron libre acceso a alimentos y agua la noche anterior y durante la realización del estudio. La curva de niveles de glucosa sérica recogida en la **Figura 4** indica que, con la dosis de pentobarbital utilizada, los niveles iniciales de glucosa descendieron aproximadamente un 25% a los 30 minutos, para alcanzar de nuevo los niveles iniciales al cabo de 1-2 horas, lo que coincide con el tiempo al cual el efecto de la anestesia desaparece y las ratas despiertan. Además, se observa un descenso en los niveles de glucosa entre 180 min. y 360 min.

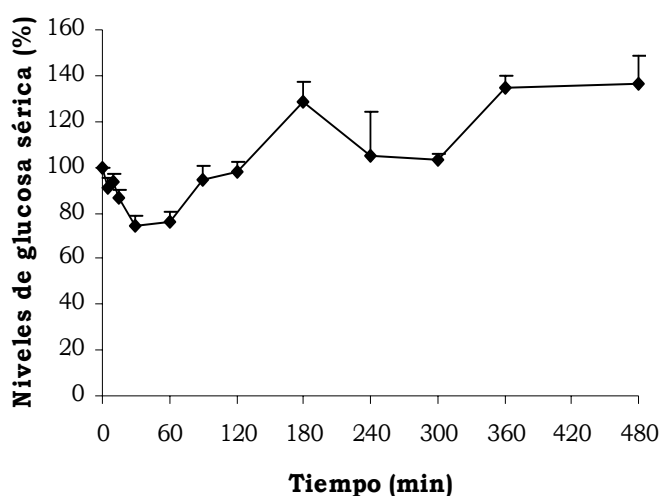


Figura 4. Niveles de glucosa sérica de ratas anestesiadas, no mantenidas en ayuno previo y con libre acceso a alimentos durante la realización del estudio (n=4).

Efecto de los alimentos sobre la evolución de los niveles de glucosa sérica tras la administración intratraqueal de una solución de PBS pH 7.4 en ratas anestesiadas y no mantenidas en ayuno previo:

Debido al descenso en los niveles de glucosa al cabo de 180 min., observado en el estudio anterior, decidimos evaluar si este efecto podía deberse al libre acceso de los animales a los alimentos. Para ello, hicimos un estudio

comparativo con libre acceso y sin acceso a alimentos entre grupos de ratas anestesiadas y no mantenidas en ayuno previo. En este caso se procedió a la instilación intratraqueal de 90 μ l de PBS 7.4.

En la **Figura 5** se recogen los resultados obtenidos en presencia o no de alimentos. Debido a que los niveles de glucosa resultaron más estables (aunque no diferentes significativamente) para el grupo de ratas que no había tenido libre acceso a alimentos durante la realización del ensayo, decidimos llevar a cabo los estudios posteriores en estas condiciones.

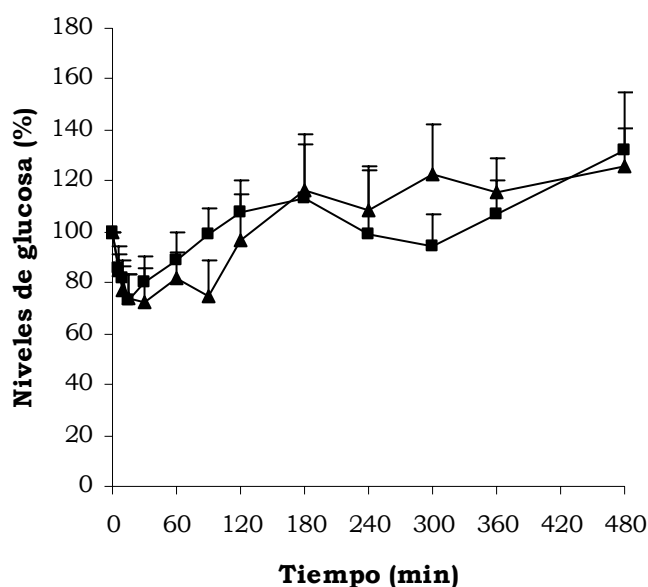


Figura 5. Niveles de glucosa sérica de ratas tras la administración de 90 μ l de PBS pH 7.4, (▲) sin acceso y (■) con libre acceso a alimentos durante la realización del estudio (n = 5-6).

De la comparación de las **Figuras 4** y **5**, también se puede deducir que la administración de la solución de PBS pH 7.4 no produjo cambios adicionales en la evolución de la glucemia de los animales, ni tampoco lo hizo el estrés que podría suponer la manipulación necesaria para la administración intratraqueal.

CONCLUSIONES:

A partir de estos ensayos preliminares, pudimos concluir que los niveles séricos de glucosa se veían afectados por las variables investigadas de la siguiente manera:

- El ayuno produce una disminución del 50% en los niveles de glucosa de ratas anestesiadas a tiempo = 0
- La variabilidad en los niveles de glucosa es mayor cuando el estudio se lleva a cabo en presencia de alimentos.
- La manipulación de los animales para la administración intratraqueal de la solución de PBS pH 7.4, no produce una variación adicional de los niveles de glucosa.

Las condiciones seleccionadas a partir de estos resultados, para la posterior administración de las microsferas conteniendo insulina (trabajo recogido en **Art. 4**), fueron las siguientes:

- No someter a las ratas a ayuno durante la noche anterior a la realización del estudio
- No permitir a las ratas el libre acceso a alimentos durante la realización del estudio

Referencias bibliográficas:

Edwards, D.A., Hanes, J., Caponetti, G., Hikach, J., Ben-Jebria, A., Eskew, M.L., Mintzes, J., Deaver, D., Lotan, N., Langer, R., 1997. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science*, 276, 1868-1871.

Mitra, R., Pezron, I., Li, Y., Mitra, A.K., 2001. Enhanced pulmonary delivery of insulin by lung lavage fluid and phospholipids. *Int. J. Pharm.*, 217, 25-31.

Okumura, K., Iwakawa, S., Yoshida, T., Komada, F., 1992. Intratracheal delivery of insulin. Absorption from solution and aerosol by rat lung. *Int. J. Pharm.*, 88, 63-73.

Todo, H., Okamoto, H., Iida, K., Danjo, K., 2001. Effect of additives on insulin absorption from intratracheally administered dry powders in rats. *Int. J. Pharm.*, 220, 101-110.

***Parte II.2. Puesta a punto del estudio de distribución
in vivo de las microsferas de quitosano***

PARTE II.2

Puesta a punto del estudio de distribución *in vivo* de las microsferas de quitosano.

La técnica de microscopía láser confocal fue seleccionada para el estudio de distribución de una disolución de isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA) y de las microsferas de quitosano conteniendo FITC-BSA, tras su administración por vía intratraqueal a ratas. Para ello, se llevó a cabo la tinción del tejido pulmonar utilizando sal sódica de sulforodamina B. La rodamina B es un marcador anfotérico fluorescente relativamente lipofílico que no tiene carga a pH fisiológico. Esta molécula tiene un alto coeficiente de partición (octanol/buffer = 276) (Araie y Maurice, 1987) y cuando se utiliza para la tinción del tejido pulmonar, se observa su distribución en las regiones lipofílicas de los cuerpos laminares de las células *Tipo II*, en la superficie del epitelio alveolar y en los macrófagos alveolares (Pohl y col., 1998). Nosotros hemos seleccionado una sal sódica de sulforodamina B, diferente a las utilizadas por Lombry y col. (sulforodamina 101) (Lombry y col., 2002) y Pohl y col. (rodamina B) (Pohl y col., 1998). Por lo tanto, fue imprescindible asegurarnos de su capacidad para marcar el tejido pulmonar con una definición adecuada para poder comparar nuestros resultados con los de estos trabajos ya publicados (Pohl y col., 1998; Lombry y col., 2002).

En este apartado se describe la puesta a punto del procedimiento utilizado para la tinción de los pulmones y su posterior observación por la técnica de microscopía confocal. Para ello, era preciso obtener imágenes contrastadas del tejido marcado con sulforodamina y de las formulaciones conteniendo FITC-BSA, por lo que en los resultados se muestran fotografías obtenidas tras la administración de algunas formulaciones conteniendo FITC-BSA. No obstante, no es objetivo de este apartado discutir los resultados de distribución *in vivo* de las formulaciones, los cuales serán presentados en la **Parte II.3 (Art. 4)**.

OBJETIVOS:

Los objetivos del trabajo preliminar recogidos en este apartado fueron:

- Comprobar la eficacia de la sal sódica de sulforodamina B como marcador del tejido pulmonar.
- Identificar el procedimiento más adecuado de obtención de cortes de tejido pulmonar para su observación por microscopía confocal.
- Discernir, entre dos posibles procedimientos de perfusión, cual ofrecía una mayor definición del tejido pulmonar.
- Detectar, dentro del pulmón, las zonas de mayor depósito de las formulaciones de FITC-BSA ensayadas.

PARTE EXPERIMENTAL:

Materiales:

Los materiales utilizados fueron: sal sódica de sulforodamina B, cacodilato sódico trihidratado, glutaraldehído (*Sigma Aldrich*, Spain); formaldehído (*Vorquímica*, Spain) y agua Milli-Q (*Milli-Q plus*, *Millipore Ibérica*, Spain).

Se utilizaron como animales de experimentación ratas Sprague-Dawley macho, con pesos comprendidos entre 250 y 300 g.

Métodos:

Para realizar estos estudios se utilizaron tanto pulmones de animales no tratados como de animales que habían sido tratados previamente con formulaciones conteniendo FITC-BSA. A continuación se describen los métodos utilizados para administrar las formulaciones marcadas con FITC-BSA, así como los métodos de perfusión y de tratamiento de las muestras de pulmón previo a su análisis por microscopía confocal.

Procedimiento de administración intratraqueal a ratas de formulaciones conteniendo FITC-BSA:

Los animales fueron anestesiados utilizando pentobarbital sódico por inyección intraperitoneal (53 mg/kg) y se colocaron, con la parte ventral expuesta hacia arriba, sobre una mesa quirúrgica. A continuación, se procedió a la exposición de la tráquea a través de una incisión longitudinal en el cuello del animal y a la administración de las formulaciones, siguiendo los procedimientos que se indican a continuación:

a) *Instilación de disolución de FITC-BSA:* Se insertó una cánula (endovenosa, *Johnson & Johnson MEDICAL*, España) entre los anillos quinto y sexto de la tráquea, hasta una profundidad de 12-15 mm y se procedió a la administración de la disolución (90 μ l; 150 μ g/100 μ l) en PBS 7.4, a través de la cánula (**Figura 1**).

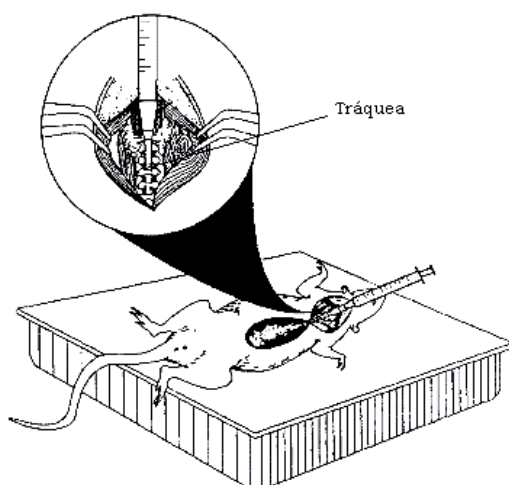


Figura 1. Esquema del método de administración de disolución de FITC-BSA en PBS 7.4 por instilación intratraqueal.

b) *Administración de microsferas en forma de polvo seco:* En este caso, se utilizó la punta de una aguja inyectable para abrir la tráquea (en la misma posición que se describió anteriormente) de manera que permitiera la inserción de una cánula traqueal (con adaptador en forma de Y y diámetro externo de 1.3 mm,

Harvard Apparatus). El polvo seco a administrar se pesó directamente en un conector en forma de Y que se acopló a la cánula (**Figura 2**), y se conectó al ventilador (*Harvard Apparatus, Inspira ASV 55-7058*, USA, **Figura 3**) en el que se fijan las condiciones de 80 respiraciones por minuto y 1.53 cm³ de volumen de aire.

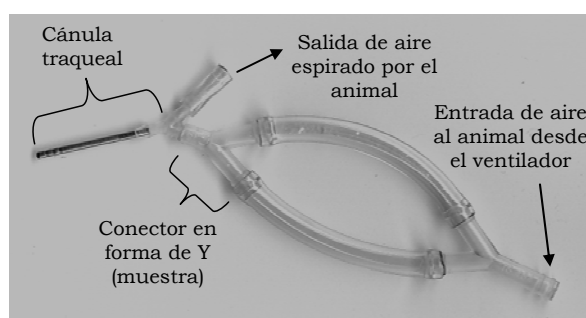


Figura 2. Esquema del dispositivo utilizado para la administración del polvo seco (los sitios de entrada y salida de aire se conectaron al ventilador utilizando tubos de tygon®).



Figura 3. Fotografía del ventilador Harvard Apparatus, Inspira ASV 55-7058.

Tras la administración de cada formulación (solución de FITC-BSA y microsferas de quitosano conteniendo FITC-BSA obtenidas por las técnicas de emulsificación/evaporación del disolvente y atomización) la cánula se retiró de la tráquea del animal y se suturó la piel del cuello (suturas quirúrgicas *Johnson &*

Johnson MEDICAL, España). Los animales se recuperaron de la anestesia en 1-2 horas.

Disoluciones perfundidas:

Se prepararon las siguientes disoluciones:

- Disolución A = Tampón fosfato (PBS 7.4) conteniendo sal sódica de sulforodamina (0.1%).
- Disolución fijadora B = 0.6% de formaldehído-0.9% de glutaraldehído en tampón cacodilato (pH 7.4, 75 mM) conteniendo 0.1% de sal sódica de sulforodamina.

Procedimientos de perfusión:

A tiempos pre-establecidos, las ratas fueron sacrificadas con una dosis letal de pentobarbital (de acuerdo con la Directiva 86/609/EEC del 24 de Noviembre de 1986 de la Comisión Europea) y se expusieron sus cavidades torácicas. Para proceder a la perfusión de los pulmones, se ensayaron los dos métodos que se describen a continuación:

a) *Perfusión vascular:* En este caso la preparación de los pulmones se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Lombry y colaboradores (Lombry y col., 2002) el cual fue ligeramente modificado. Se introdujo profundamente un microperfusor en la aurícula derecha del corazón hasta que se pudo observar dentro del tronco pulmonar. A continuación, se hizo pasar la disolución A (100 mL) utilizando una bomba peristáltica [Spetec GmbH, Perimax 12 model; Germany] a una velocidad de flujo de 20 mL/min y se hizo un pequeño corte en el atrio derecho del corazón para permitir la salida de la solución por esta vía. Luego, se fijaron los pulmones con 50 mL de la disolución B que se hizo pasar a una velocidad de flujo de 15 mL/min. Una vez concluido este proceso, se extrajeron los pulmones, con ayuda de material quirúrgico, para su análisis por microscopía láser confocal de fluorescencia (CLSM, Leika TCS-SP2, Alemania).

b) *Perfusión intratraqueal*: Se procedió de igual manera que en el método anterior, con la diferencia de que las disoluciones A y B fueron perfundidas intratraquealmente. Una vez introducido el microperfusor en la tráquea, se ató hilo de sutura alrededor de la tráquea para fijar ésta con el microperfusor y a su vez evitar la fuga de las soluciones de perfusión por la misma vía de entrada. A continuación, se extrajeron los pulmones para su análisis como se describió anteriormente.

Preparación de las muestras de pulmón para su análisis por microscopía confocal:

Una vez extraídos los pulmones, se separaron cada uno de los lóbulos pulmonares de las ratas (**Figura 4**) con ayuda de un bisturí.

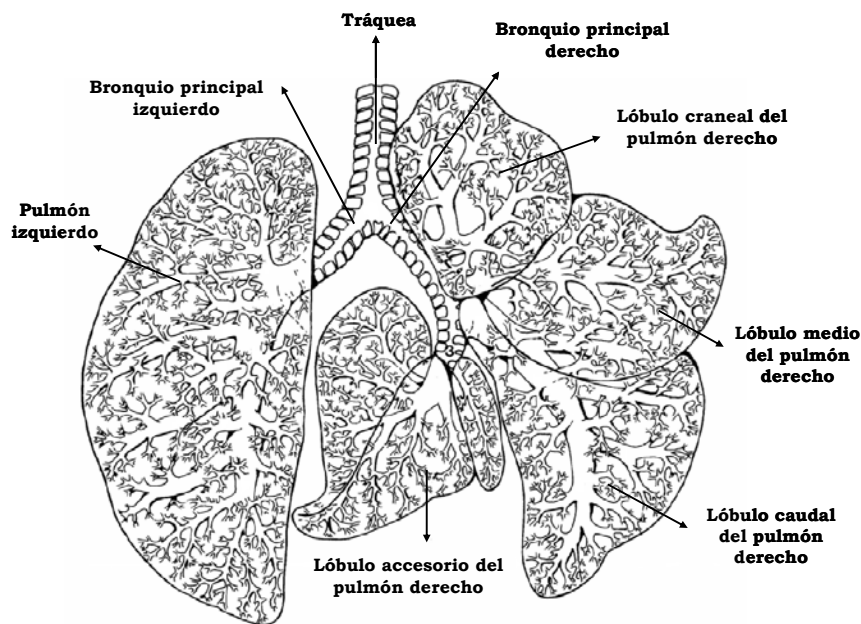


Figura 4. Esquema del pulmón de la rata.

La preparación de las muestras para su observación por microscopía confocal, se realizó utilizando dos procedimientos que se describen a continuación.

a) Se realizaron cortes (aproximadamente 2 mm) de los lóbulos con bisturí, los cuales se colocaron en una solución de sacarosa al 30% durante 15 minutos y se congelaron utilizando Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Holanda) bajo atmósfera de nitrógeno líquido. Se realizaron cortes de 60 μm utilizando un Criomicrotomo (Cryocut 1800, Reichert-Jung, Alemania) y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio. Se adicionaron unas gotas de PBS 7.4 al tejido para evitar su deshidratación y se cubrieron con cubreobjetos de vidrio.

b) Los cortes de aproximadamente 2 mm, realizados con el bisturí se pusieron directamente sobre portaobjetos de vidrio con cavidad y se cubrieron con cubreobjetos tras la adición de gotas de PBS 7.4.

Para observar el tejido, éste fue escaneado utilizando el microscopio confocal a las longitudes de onda de excitación de 488 y 568 y se obtuvieron las emisiones fluorescentes de FITC-BSA (λ de emisión = 515-545) y sulforodamina (λ de emisión = 564-648) en canales separados. Las imágenes se pseudo-colorearon de verde para la FITC-BSA y de rojo para la sulforodamina y luego se superpusieron para formar una imagen multicolorada. Se obtuvieron imágenes con las lentes de 10x, 20x, 40x, 63x y 100x.

RESULTADOS y DISCUSIÓN:

Como se puede observar en las imágenes recogidas en la **Figura 4**, que corresponden a cortes realizados con el criomicrotomo, la tinción del tejido pulmonar con la sal sódica de sulforodamina B utilizada en este trabajo, permitió obtener por microscopía confocal imágenes con una correcta definición del epitelio alveolar. A continuación, se procedió a comparar estas imágenes (obtenidas con el criomicrotomo) con las imágenes obtenidas directamente sobre cortes del pulmón de 2 mm, según se describió en la sección anterior. Como se puede apreciar en la **Figura 5**, las fotografías realizadas directamente sobre los cortes de 2 mm, presentan una calidad similar a las imágenes obtenidas con el criomicrotomo, por lo cual este segundo método (sin criomicrotomo) fue seleccionado para el resto del estudio por ser más sencillo.

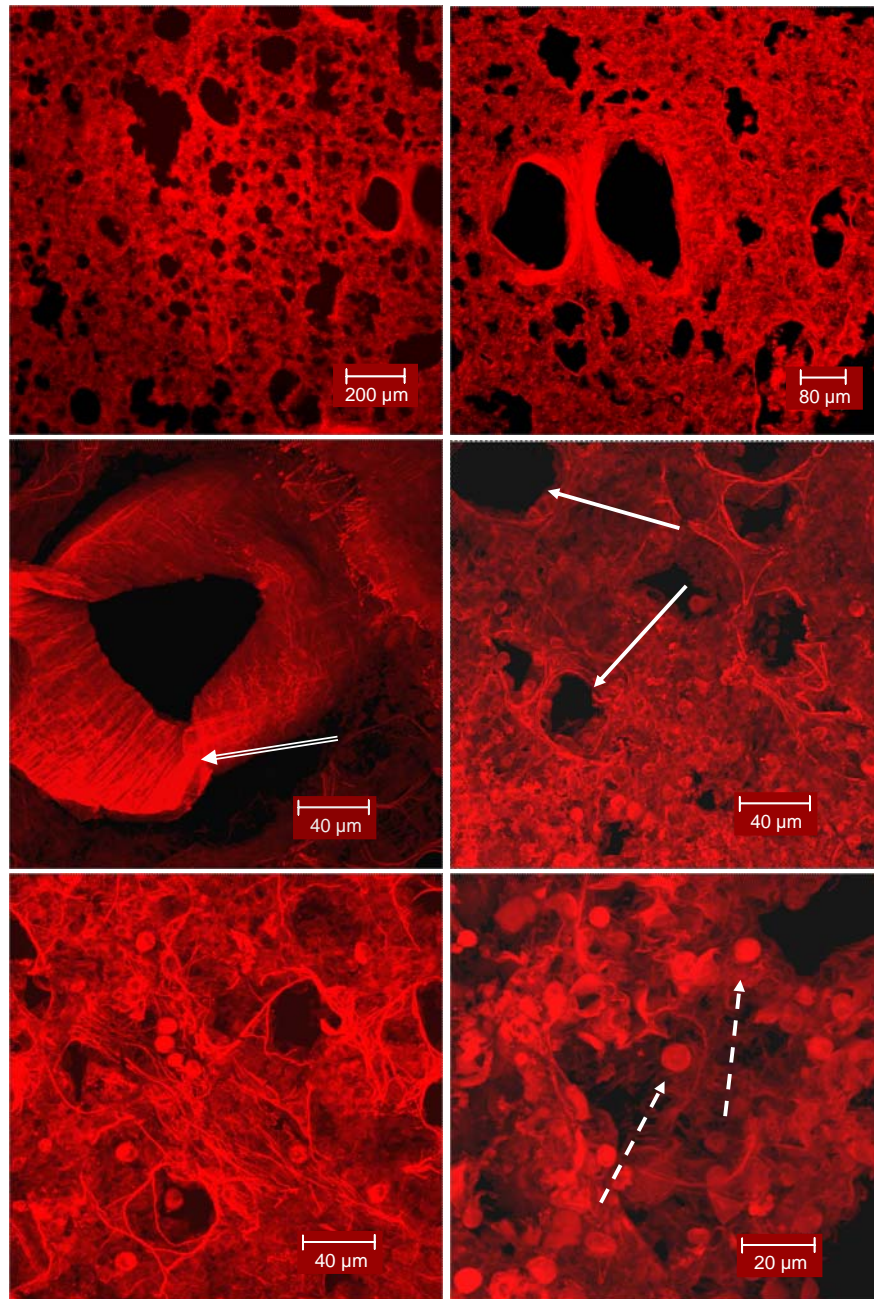


Figura 4. Imágenes obtenidas por CLSM a partir de cortes de 60 μm realizados utilizando el criomicrotomo, tras perfusión por vía vascular. Flechas discontinuas = macrófagos alveolares; flechas continuas = alvéolos; flecha doble línea = bronquiolo.

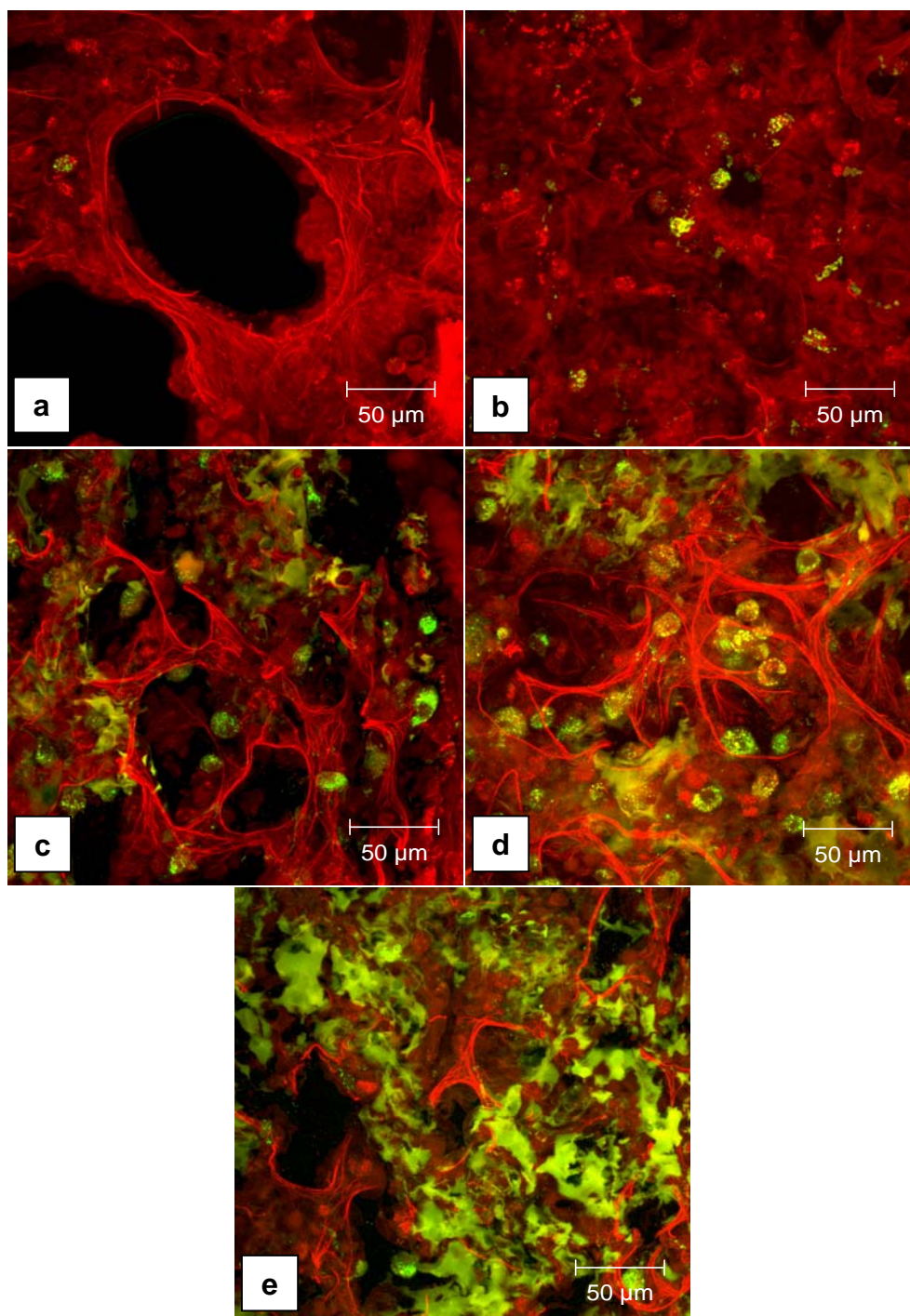


Figura 5. Imágenes obtenidas por CLSM de cortes del tejido pulmonar de 2 mm, tras la perfusión por vía vascular, (a,b) 1 hora y (c,d,e) 2 horas después de la administración de (a,b) microsferas de quitosano preparadas por el método de emulsificación y (c,d,e) solución de FITC-BSA en PBS 7.4 (150 μg/100μl).

El siguiente objetivo que nos propusimos fue comparar los dos métodos de perfusión (vascular e intratraqueal) para determinar cual de ellos ofrecía una mejor definición del tejido alveolar. Las fotografías presentadas hasta el momento, fueron obtenidas tras la perfusión por vía vascular, que ofrecen imágenes adecuadas del tejido. Para tener una mejor percepción de las diferencias entre este método y el de perfusión por vía intratraqueal, en la **Figura 6** se presentan de manera conjunta imágenes obtenidas por ambos métodos. Cuando Pohl y col. (Pohl y col., 1998) perfundieron el pulmón de ratas con rodamina B por vía vascular, encontraron que las células más iluminadas eran cuboideas y mostraban un núcleo no-fluorescente e intensa fluorescencia en su citoplasma en forma de puntos. Los autores atribuían esta intensa fluorescencia a los cuerpos laminares de las células alveolares de *Tipo II*, por los que la rodamina presenta cierta afinidad. Por el contrario, los macrófagos se mostraban con un citoplasma moderadamente fluorescente y núcleo oscuro no-fluorescente, siendo mucho más evidentes tras la perfusión por vía intratraqueal. En nuestro trabajo se pudo apreciar que cuando la perfusión se realiza por vía intratraqueal, la sal de sulforodamina B ilumina preferentemente los macrófagos alveolares y la superficie del epitelio alveolar, sin apreciarse en este último las células de *Tipo II*. En cambio, cuando la sal de sulforodamina se administra por vía vascular, los macrófagos alveolares, aunque teñidos, no aparecen tan marcadamente fluorescentes. A pesar de esto, la perfusión por vía vascular nos permitió una mejor diferenciación de las células alveolares de *Tipo II*, en comparación con la vía intratraqueal. Debido a que los macrófagos alveolares son en cualquier caso perfectamente reconocibles debido a su capacidad de captura de material exógeno, la perfusión vascular fue seleccionada para llevar a cabo los estudios de distribución de las formulaciones marcadas con FITC-BSA, que se recogen en la **Parte II.3 (Art. 4)**.

Para conocer cuáles son las zonas de depósito preferente de las formulaciones ensayadas, cada uno de los lóbulos del pulmón (**Figura 4**) fue dividido en dos partes, el más cercano a la tráquea y el más alejado. Según los resultados obtenidos durante los primeros estudios realizados, apenas se encontró depósito de las formulaciones en el pulmón izquierdo y lóbulos medio,

caudal y accesorio del pulmón derecho. Por el contrario, fue en el lóbulo craneal del pulmón derecho donde se encontró una mayor concentración. Debido a que el objetivo de estos estudios era evaluar de forma únicamente cualitativa el depósito *in vivo* de las formulaciones, las imágenes que se presentan en la **Parte II.3 (Art. 4)** se obtuvieron a partir de cortes del lóbulo craneal.

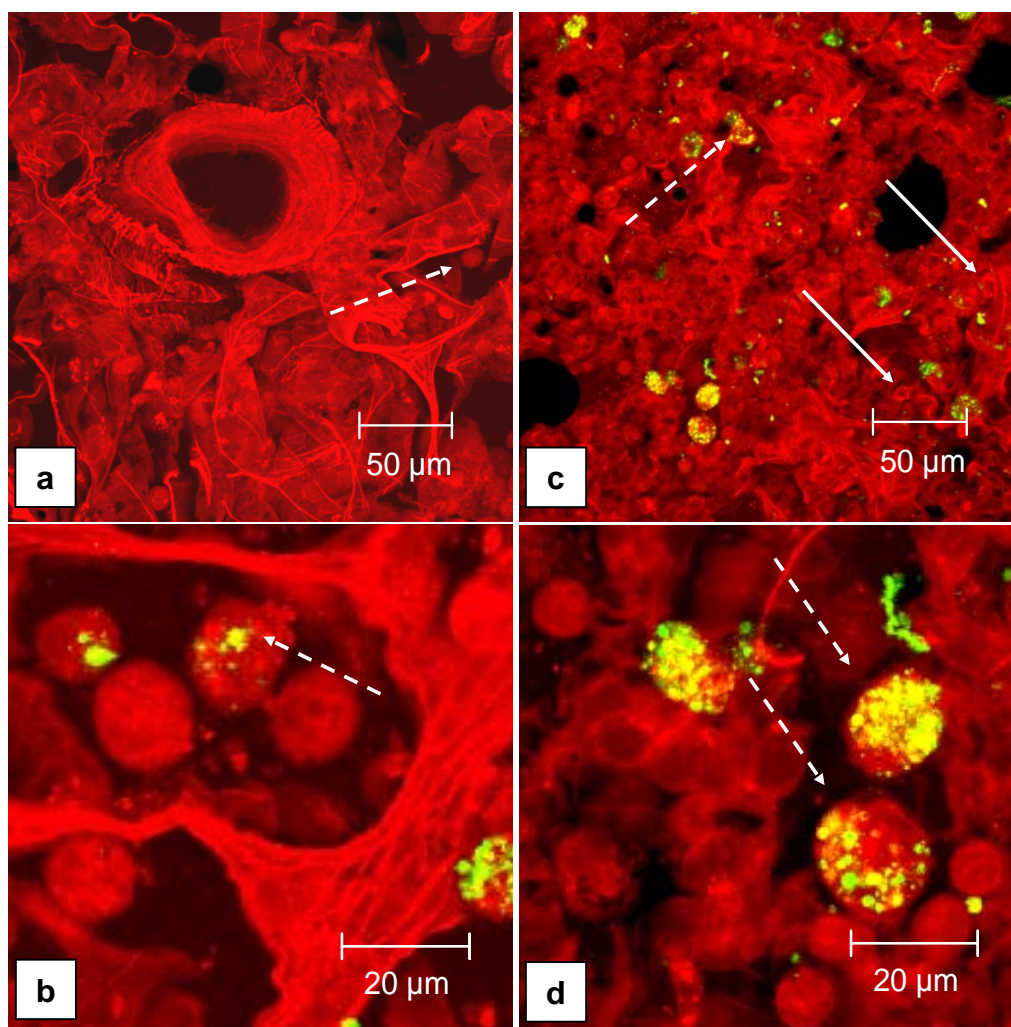


Figura 6. Imágenes obtenidas por CLSM de cortes de 2 mm del tejido alveolar. Perfusión por vía (a,b) intratraqueal, 1h tras administración de microsferas de quitosano obtenidas por emulsificación; (c,d) vascular, 2h tras administración de microsferas de quitosano obtenidas por atomización. Las flechas discontinuas = macrófagos alveolares y las continuas = células alveolares de Tipo II.

CONCLUSIONES:

A partir de los resultados de los estudios preliminares de distribución pudimos concluir que:

1. La sal de sulforodamina B utilizada, aporta una buena definición del tejido pulmonar.
2. Las imágenes obtenidas a partir de los cortes del tejido de 2 mm de grosor, muestran una calidad adecuada.
3. La vía de perfusión vascular proporciona una mejor definición del tejido pulmonar en su conjunto.
4. La zona de mayor depósito de las formulaciones ensayadas es el lóbulo craneal del pulmón derecho.

Por todo ello, estas fueron las condiciones seleccionadas para realizar los estudios que se recogen la **Parte II.3 (Art. 4)**.

Referencias bibliográficas:

Araie, M., Maurice, D., 1987. The rate of diffusion of fluorophores through the corneal epithelium and stroma. *Exp. Eye. Res.*, 44, 73-87.

Pohl, R., Kramer, P.A., Thrall, R.S., 1998. Confocal laser scanning microscopy of intact unfixed rat lungs. *Int. J. Pharm.*, 168, 69-77.

Lombry, C., Bosquillon, C., Préat, V., Vanbever, R., 2002. Confocal imaging of rats lungs following intratracheal delivery of dry powders or solutions of fluorescent probes. *J. Control. Release*, 83, 331-341.

Parte II.3. Estudio in vivo de las microsferas de quitosano

Artículo 4

Enhancement of protein lung absorption using chitosan microspheres

Dayamí Carrión-Recio^a, Cristina Taboada-Montero^b, Jose Luis Vila-Jato^a and
Carmen Remuñan-López^{a*}

^a *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology.* ^b *Department of
Physiology. Faculty of Pharmacy. University of Santiago de Compostela. 15782.
Santiago de Compostela. Spain.*

* Corresponding author: Tel.: 00 34 981 563100 – ext. 15045

Fax: 0034 981 547148

e-mail: ffcarelo@usc.es

Artículo sometido a evaluación por Pharmaceutical Research

ABSTRACT

Purpose: The objective of this work was to investigate *in vivo* the application of chitosan microspheres prepared by double (O₁/W/O₂) emulsion/solvent evaporation and spray-drying (SD) techniques as lung protein carriers. **Methods:** The extent of hypoglycemic responses following intratracheal administration of insulin-loaded chitosan microspheres to rats were evaluated and compared to those corresponding to insulin solutions. Lung deposition of chitosan microspheres was assessed by confocal imaging after administration of FITC-BSA loaded formulations. **Results:** Statistical comparison of the areas above the serum glucose curves until 100% of recovery (AAC_{→100%}) indicates that O₁/W/O₂ microspheres containing 15% of insulin (13.1 U/Kg) induce a significantly ($P < 0.05$) more prolonged hypoglycemic response than the same dose of solution and that of the corresponding SD formulation, which in this latter case is probably due to differences in particle size. Furthermore, the hypoglycemic effect produced by a higher amount of SD microspheres (7.5% of insulin) is also more prolonged than that obtained with the lower amount of SD microspheres (15% w/w) for the same dose of insulin (13.1 U/kg). In addition, capture of FITC-BSA-loaded O₁/W/O₂ particles by alveolar macrophages appears to be slower than that of FITC-BSA-loaded SD microspheres. **Conclusions:** The present work demonstrates that chitosan microspheres prepared by spray-drying and mainly double emulsion/solvent evaporation techniques, are adequate for protein delivery to the lung.

INTRODUCTION

Nowadays, the pulmonary route is being extensively explored as alternative for the systemic administration of macromolecular drugs. In the last decade it has been demonstrated that a number of peptides and proteins are more efficiently absorbed from the lungs compared to oral, nasal or transdermal routes (1). The efficiency of the lungs for the absorption of peptides and proteins arises from a number of advantages including a non-invasive method of delivery, wide absorptive surface area for absorption in the alveoli, a narrow diffusion path to the blood stream, elevated blood flow, relatively low proteolytic activity as well as avoidance of first pass hepatic metabolism (2,3). These characteristics permit a fast absorption and high bioavailability. While a great deal of recent research has been focused on the development of novel devices, attention should now be paid to the formulation of these macromolecular drugs. Deposition of inhaled particles in the appropriate lung region depends, to a great extent, on the particle size. There are discrepancies among the different authors concerning the optimum aerodynamic particle size to maximize pulmonary drug absorption, which is considered to vary within the range of 0.5 μm - 7 μm (4), 1 μm - 5 μm (5) or approximately 3 μm (6).

Aerosolized particles encounter various physiological barriers before they can reach the drug site of absorption. In the tracheobronchial region, the mucociliary escalator acts as an efficient self-cleaning mechanism, eliminating particles and dissolved drugs that have been entrapped in the mucus. On the other hand, particulate systems designed to have systemic action, may be engulfed by the alveolar macrophages once they reach the alveolar region. The success of pulmonary administration of peptide and protein drugs could be reinforced by incorporating them in special formulations, such as polymer or lipid microspheres, displaying appropriate morphological and aerodynamic characteristics, which could prolong the residence of the administered drug in the alveoli, resulting in sustained protein plasma levels and prolonged pharmacological effects (5,6).

Chitosan (CS) is a mucoadhesive polysaccharide (7) with an increasing importance as mucosal protein carrier because of its well-documented biocompatibility and low-toxicity following intravenous, oral and nasal administration (8-10). Furthermore, it has been shown that CS is rapidly biodegraded in the rich lysozyme-containing mucus (8,11). The evidence of the ability of CS to increase the penetration of macromolecules across nasal mucosa (10), intestinal epithelial cells (12-15) and buccal cell culture model (16) was first demonstrated for CS solutions. Thereafter, we have shown the potential of CS nanoparticles to further improve the absorption of peptides through the nasal mucosa (17). Furthermore, we observed that they display a significant interaction with the human intestinal cell lines (18,19), suggesting that they are taken up and transported by adsorptive endocytosis (20). CS surface-modified nanospheres were also shown to improve the pulmonary delivery of peptide drugs, which could be attributed to their adherence to lung tissue (21,22). Also, *in vitro* permeability and fluorescence microscopy studies on the tight junctions of the 16HBE14o- cell lines further confirmed the ability of CS-based microparticles to enhance penetration (23). To our knowledge, up until now, CS microspheres have not been investigated for pulmonary peptide/protein administration yet.

We have developed a double emulsion/solvent evaporation ($O_1/W/O_2$) method (24) to produce CS microspheres that are aerodynamically adequate for lung delivery. The suitability of these CS microspheres for the entrapment and controlled release of proteins was demonstrated using insulin and fluorescein isothiocyanate-labeled bovine serum albumin (FITC-BSA) as model compounds. We hypothesized that the CS microspheres could promote the protein transport through the lung surface by remaining in the absorption site for a prolonged period of time, interacting with the epithelial cells and opening the cells' tight junctions (21).

Taking all this into account, the objective of this work was to investigate the *in vivo* behavior of the previously developed CS microspheres and compare them to the standard microspheres obtained using a spray-drying (SD) technique. More precisely, our aim was first to estimate the extent of the hypoglycemic effect

following intratracheal administration to normal rats of insulin-loaded CS microspheres. Furthermore, FITC-BSA loaded CS microspheres were administered to rats and the lungs were visualized using confocal imaging, in order to obtain an overview of the pulmonary disposition of CS microspheres.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The following chemicals were purchased from commercial suppliers and used as received: chitosan glutamate (CS) (Sea cure[®] G 210; Mw = 300 kDa, deacetylation degree > 80%) (*Pronova Lab.*, Norway); insulin from bovine pancreas, fluorescein isothiocyanate labeled bovine serum albumin (FITC-BSA), cottonseed oil, sulforhodamine B sodium salt, sodium cacodylate trihydrate, glutaraldehyde (*Sigma Aldrich*, Spain); methylene chloride (*Romil*, Spain) and formaldehyde (*Vorquímica*, Spain). Ultrapure water (*Milli-Q plus*, *Millipore Ibérica*, Spain) was used throughout. All other chemicals were reagent grade.

Preparation of chitosan microspheres

CS microspheres were prepared by the double (O₁/W/O₂) emulsion/solvent evaporation technique previously developed (24). Briefly, insulin and FITC-BSA (14.4 mg, 15% based on CS) were dissolved in 4.8 ml of NaOH 0.01N and water, respectively, and mixed with 4.8 ml of a CS solution (2% w/w in water) [vortex mixer, 2400 min⁻¹, *Heidolph REAX 2000*, Germany] to form a W phase (1% w/w with respect to CS in water). Methylene chloride (600 µl) was emulsified in the W phase by sonication [10 seg., output 4, *SONIFIER[®] 250 Branson*, United Kingdom] to obtain the first emulsion O₁/W. After, this simple emulsion was added to 150 g of cottonseed oil containing Span[®] 85 (0.1% w/w) under mechanical stirring [750 rpm, *Janke & Kunkel/KA-WERK, model RW 20 DZM*, Germany] at 37°C to form the O₁/W/O₂ emulsion. The system was stirred for 14 hr to allow the evaporation of the inner phase solvent. Finally, microspheres were isolated by vacuum filtration [0.45 µm, white nylon, HNWP, 47

mm, membrane filters, *Millipore Corporation*, U.S.A.], washed with n-hexane and freeze-dried [-30°, 24 hr, *Labconco apparatus*, *Labconco Corp.*, Kansas City, MI, USA]. Microspheres were stored in a dessicator at room temperature until their use.

Control microspheres were also prepared by spray drying. Insulin (7.5% and 15% based on CS) or FITC-BSA (15 % w/w based on CS) were dissolved in 25 ml of NaOH 0.01N and water, respectively, as before. After, the protein solution and 25 ml of a 2% w/v CS solution in water were mixed by magnetic stirring to form a 1% w/w solution which was spraydried [*Büchi mini spray dryer*, model 190, *Büchi AG*, *Labortechnik*, Switzerland] using a two-fluid nozzle (0.5 mm). The standard operating conditions were: Inlet air temperature = 120-130°C, outlet air temperature = 70-90°C, drying air flow rate = 600 NL/h, liquid feed rate = 2,5 ml/min. Microspheres were freeze-dried [-30°, 24 hr, *Labconco apparatus*, *Labconco Corp.*, Kansas City, MI, USA] and stored as described above.

Morphological characterization of microspheres

Microspheres were coated with gold palladium to achieve a film of 70 nm thickness (*High Resolution Sputter Coater SC7640*, *Thermo VG Scientific*, England) and observed with a scanning electron microscope (*SEM*, *JSM-6400*, Tokyo, Japan) to assess their surface properties.

Determination of density and aerodynamic diameter of microspheres

Real density of particles was determined by Helium pycnometry (*Micropycnometer*, *Quanta Chrome*, model *MPY-2*, U.S.A., n=3). The number count mean aerodynamic diameter (NAD) was determined using a *TSI Aerosizer® LD* analyzer equipped with an *Aerodisperser®* (*Amherst Process Instrument, Inc*, Amherst, MA, U.S.A) based on direct time-of-flight measurements (n=3).

In vivo studies

Protocol of intratracheal administration of the solutions and microspheres

Rats (male Sprague Dawley, 250-300 g) were anesthetized using pentobarbital intraperitoneal injection (53 mg/kg) and placed ventral side up on a surgical table. The trachea was exposed through a longitudinal incision along the ventral aspect of the neck. Four different insulin solutions (90 µl; doses: 7.4 U/kg, 13.1 U/kg, 17.4 U/kg and 27.4 U/kg) and a FITC-BSA solution (90 µl; 150 µg/100 µl) in PBS 7.4 were instilled through an i.v. cannula [Johnson & Johnson MEDICAL, Spain] easily inserted into the lumen of the trachea between two cartilaginous rings to a depth of 12-15 mm. Microspheres in form of dry powders (Table 1) were insufflated through a tracheal cannula [with Y-adapter, OD=1.3 mm, Harvard Apparatus]. First, a tip of a needle was used to open a little the trachea (enabling the easy insertion of the cannula into the lumen of the trachea) and then, the cannula was connected to a Harvard® ventilator [Inspira ASV 55-7058, USA, 80 breaths per minute, 1.53 cm³ of tidal volume]. After solution or microspheres delivery, the cannula was removed and the rat's neck sutured with surgical sutures [Johnson & Johnson MEDICAL, Spain]. Rats recovered from the anesthesia within 1h to 2h. Studies were conducted in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (NIH Publication No. 85-23, revised 1985).

Table 1. Details of the *in vivo* investigated microspheres. O₁/W/O₂ = microspheres obtained by double emulsion/evaporation; SD = microspheres produced by spray-drying.

Production method	Protein	Protein content in microspheres	Microspheres amount	Protein amount
O ₁ /W/O ₂		15% w/w	750 µg/250 g rat	
SD	Insulin	15% w/w	750 µg/250 g rat	0.11 mg/250 g rat (= 13.1 U/Kg)
SD		7.5% w/w	1500 µg/250 g rat	
O ₁ /W/O ₂	FITC-BSA	15% w/w	750 µg/250 g rat	0.11 mg/250 g rat
SD				

Evaluation of pharmacological disposition following administration of insulin loaded formulations

Blood samples (150-200 μ l) were periodically withdrawn from the rat tail vein at 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 and 480 min after insulin solution administration and at 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 and 480 following microspheres administration. These samples were centrifuged at 3500 rpm for 5 min [*Sigma 2-15*, Germany] and the serum glucose levels were measured by the Enzymatic-Colorimetric Glucose [*GOD-PAP*, *SPINREACT*] method.

Statistical analysis of in vivo data

The area above the serum glucose curves until 100% of recovery (AAC_{0→100%}) were calculated by means of trapezoidal integration. All the data are expressed as mean \pm standard error of the mean (s.e.m.). One way analysis of variance (with the Pairwise Multiple Comparison Procedure Student-Newman-Keuls method) and Independent Student *t*-test were employed to examine any statistical significance of the data. (SigmaStat, Systat Software Inc., version 3.10). Differences were considered significant if $P < 0.05$.

Confocal fluorescence microscopy study

Lung preparation for confocal microscopy was carried out according to the method described by Lombry et al. (25) which was slightly modified. At predetermined time intervals following intratracheal delivery of FITC-BSA solution or microspheres, rats received a lethal dose of pentobarbital and their thoracic cavities were exposed. A microperfuser was introduced deeply into the upper portion of the heart muscle, until the microperfuser appeared inside the pulmonary trunk. A sulforhodamine solution (100 ml of phosphate buffered saline (PBS 7.4) containing sulforhodamine 0.1%) was perfused using a peristaltic pump [*Spetec GmbH, Perimax 12 model*; Germany] at a flow rate of 20 ml/min. The right atrium was cut to allow the solution to circulate throughout the vascular system and leave of the animal body through this site. After, lung fixation was carried out

using a fixative solution (50 ml of 0.6% formaldehyde-0.9% glutaraldehyde solution in cacodylate buffer, pH 7.4 75 mM with 0.1% sulforhodamine) at a flow rate of 15 ml/min. Lungs were removed for analysis by confocal laser scanning microscopy (CLSM, Leika TCS-SP2). Slices (± 2 mm) of the pulmonary lobes were directly placed in a sample holder and covered with a cover slip glass. Laser excitation wavelengths of 488 and 568 were used to scan lung tissue, and fluorescent emissions from FITC-BSA (emission $\lambda=515-545$) and sulforhodamine (emission $\lambda=564-648$) were collected using separate channels. Images were acquired with 63x and 100x oil immersion lenses. Greyscale images were pseudo-colored green for FITC-BSA and red for sulforhodamine and then overlaid to form a multicolored image.

RESULTS AND DISCUSSION

The main goal of the present work was to investigate the potential of chitosan microspheres for pulmonary delivery of peptides and proteins. A previous work was aimed to develop chitosan microspheres, using a new double ($O_1/W/O_2$) emulsion/solvent evaporation technique (24) and a typical a spray-drying (SD) technique. As can be deduced from results in Table 2, the investigated blank microspheres show adequate *in vitro* aerodynamic properties with mean aerodynamic diameters (NAD) ranging between 1.92 μm and 4.35 μm , real densities between 1.14-1.48 g/cm^3 and apparent tap densities as low as 0.21-0.53 g/cm^3 .

Table 2. Real density (ρ_r), tap density (ρ_t) and mean count (number) aerodynamic diameter (NAD) of blank microspheres obtained by double emulsification/evaporation ($O_1/W/O_2$) and spray-drying (SD) techniques (n=3)

Method	W solvent	ρ_t (g/cm ³)	ρ_r (g/cm ³)*	NAD (μ m)
$O_1/W/O_2$	NaOH 0.01N	0.53 \pm 0.002	1.48 \pm 0.03	4.35 \pm 1.85
$O_1/W/O_2$	H ₂ O	0.50 \pm 0.01	1.46 \pm 0.03	3.52 \pm 1.77
SD	NaOH 0.01N	0.21 \pm 0.02	1.14 \pm 0.05	1.92 \pm 1.61
SD	H ₂ O	0.31 \pm 0.01	1.25 \pm 0.01	2.33 \pm 1.75

* Densities used to calculate NAD values

Using insulin and FITC-BSA as model proteins, we expected to have information not only about the potential of chitosan microspheres increasing the insulin pulmonary absorption, but also about the *in vivo* distribution behavior of the particles. As regards the morphology of these loaded microspheres, they are spherical and their surface morphology depended on the associated protein and production method, those loaded with the insulin obtained by double ($O_1/W/O_2$) emulsion/solvent evaporation method were rougher than the others (Fig. 1). The encapsulation efficiencies were excellent for both proteins.

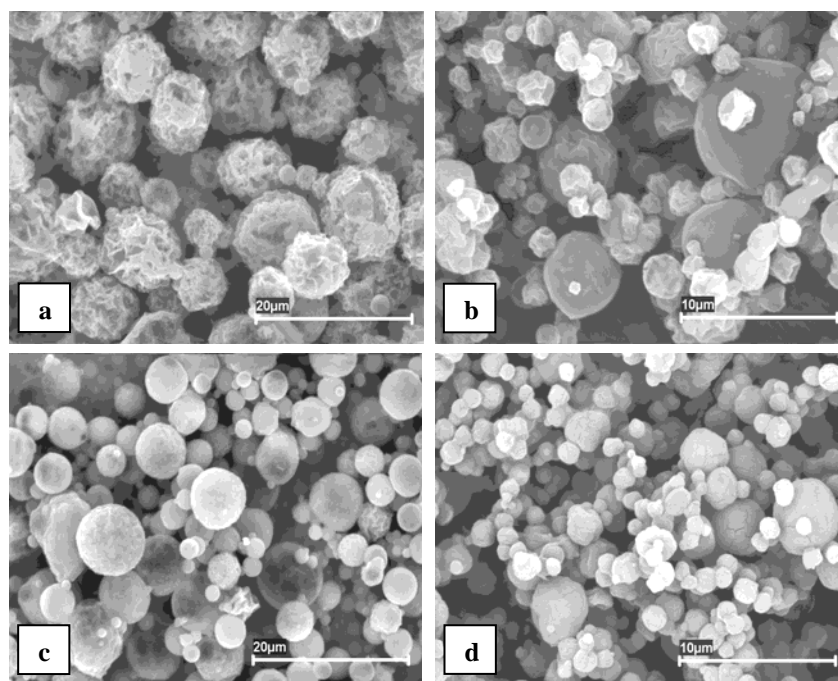


Fig. 1. SEM microphotographs of the different microspheres formulations: (a) insulin loaded (15%) microspheres prepared by double $O_1/W/O_2$ emulsion/solvent evaporation technique; (b) insulin loaded (15%) microspheres prepared by spray-drying method; (c) FITC-BSA loaded microspheres prepared by double $O_1/W/O_2$ emulsion/solvent evaporation technique; (d) FITC-BSA loaded microspheres prepared by spray-drying method.

Insulin absorption

First, the efficacy of insulin loaded microspheres was assessed by measuring the plasma glucose concentrations following intratracheal administration of various microspheres formulations and insulin solutions - used as controls - to anaesthetized rats. The hypoglycemic levels curves corresponding to the administration of various bovine insulin solutions are shown in Figure 2. The higher the dose was, the higher the decrease in the blood glucose levels and the time the rats need to recover the initial glucose levels was.

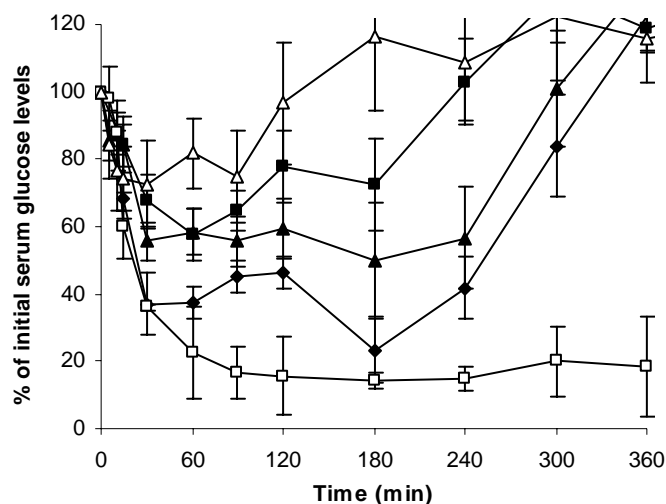


Fig. 2. Hypoglycaemic effect following intratracheal administration of (Δ) a control PBS 7.4 solution and insulin solutions in PBS pH 7.4 of doses (■) 7.4 U/kg; (▲) 13.1 U/kg; (◆) 17.9 U/kg and (□) 27.4 U/kg to normal rats (results are mean \pm S.E.M.; $n = 5-6$, except for 27.4 U/kg dose: $n = 2$).

In order to compare the relative effectiveness of the different insulin doses in lowering the blood glucose serum levels, the areas above the serum glucose curves until 100% of recovery ($AAC_{\rightarrow 100\%}$) were calculated and compiled in Table 3. The dose of 27.4 U/kg was only investigated in two animals because the hypoglycemic effect was too long (glucose concentrations varied within 22.6% and 18.3%, at 1hr and 6hr, respectively) to permit the recovery of the normal glucose levels. As a result, the rats suffered convulsions and died 6 hours after administration. Evidently, it was ethically impossible to obtain more replicates of this dose, although we decided to include the results to make a comparison with previously reported results that will be discussed in the next paragraph. Even though a 100% of glucose recovery was not achieved with this dose, we calculated the AAC until 360 min to enable the comparison with the other three insulin doses.

Table 3. Pharmacodynamic parameters related to the hypoglycaemic effects of insulin solutions administered intratracheally^a

Dose (U/kg)	^bAAC_{→100%} x 10⁻³ (%.min)	100-Glu_{min} (%)	T_{min} (min)
7.4	6.5 ± 1.3	42.4	60
13.1	12.5 ± 2.4	49.9	180
17.9	16.8 ± 2.1	76.8	180
27.4	28.0 ± 0.5*	85.6	180

^a Results are expressed as the mean ± s.e.m.; ^bAAC_{→100%}: Area above the serum glucose curve (until 100% of recovery); T_{min}: time to reach the minimum blood glucose levels; 100-Glu_{min} = 100-minimum percentage of glucose level at T_{min}; * In this case we calculated AAC_{→360 min}: Area above the serum glucose curve until 360 min.

Statistical comparison of AAC_{→100%} values indicate that the area corresponding to the 27.4 U/kg dose was significantly higher than the other three doses ($P < 0.05$). Also, AAC_{→100%} of 17.9 U/kg and 13.1 U/kg doses were significantly different among them, as well as those of 7.4 U/kg and 17.9 U/kg ($P < 0.05$). On the contrary, there was no significant difference between 7.4 U/kg and 13.1 U/kg doses. Table 3 also shows that the higher reduction of glucose levels (100-Glu_{min}) was achieved with the highest dose, although the time to reach the minimum glucose levels (T_{min}) was similar except for the lowest dose.

The relationship between the extent of decrease in serum glucose levels and the insulin dose is depicted in Figure 3.

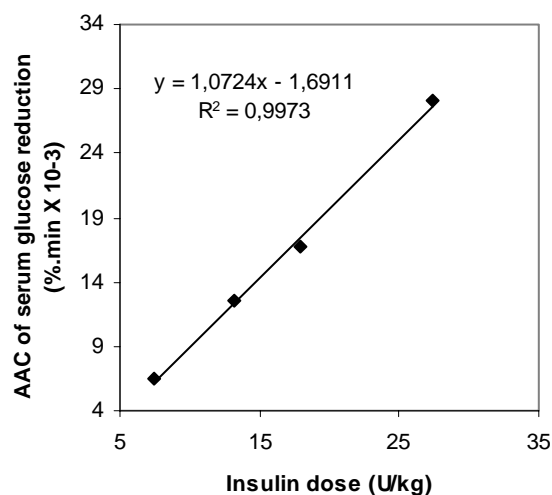


Fig. 3. Relationship between the extent of hypoglycemic response and the dose of insulin administered intratracheally.

As can be observed, the $AAC_{\rightarrow 100\%}$ values increase linearly with the dose ($r^2 = 0.9973$), which agrees with the results obtained by Liu et al.²⁶ who administered porcine insulin intratracheally to rats. Nevertheless, when Liu et al.²⁶ administered 25 IU/kg of porcine insulin, only 50% of reduction in the glucose levels was obtained with both the hexameric and the dimeric insulins, whereas we obtained an 86% reduction with a similar dose (27.4 IU/kg) of bovine insulin. It is probable that the differences in the hypoglycemic effects between both studies are related to differences in the type of insulin administered (either porcine or bovine). These authors also found a significant difference in the magnitude of the blood glucose reduction in the first 10 min between the two types of porcine insulin they administered, which was attributed to the smaller diffusion coefficient and, hence, slower transport across the alveolar sacs into the systemic circulation of the larger insulin hexamers (26). Although some authors have reported that macromolecules absorption from the lung into the blood is inversely related to the molecular weight (27-29), the results obtained by Liu et al (25) suggested that after 10 min of administration the glucose levels reached similar values because of the rapid interchangeability among oligomeric species (dimeric, smaller molecular size and

hexameric, larger molecular size). It is likely that the monomeric bovine insulin we have used in this work has a higher diffusion coefficient than that of the porcine insulin and is transported easier and faster across the alveolar epithelium into the systemic circulation, causing a higher reduction in the glucose levels.

In the case of powders, it is known that the dose reaching the respiratory tract can be dramatically reduced due to the retention of part of the dose in the administration device. In this study, the magnitude of the retention was calculated by directly weighing the powder in the “Y” connector attached to the intratracheal cannula which was, then, connected to the ventilator. In order to quantify the magnitude of the mentioned retention and to avoid differences in the effective dose, the difference in weight of the “Y” connector and the cannula before and after the insufflation was previously calculated for each powder (n = 6). The obtained percent of retention was considered for adjusting the dose.

The effect of the microspheres production method on the hypoglycemic effect of insulin loaded microspheres was evaluated by keeping the insulin content of particles at 15% (w/w) based on total microspheres weight constant. The dose of 13.1 U/kg (contained in 0.750 µg of the powder at 15% (w/w)) was selected to investigate the *in vivo* behavior of microspheres taking into account that approximately 25% of the administered powder was retained in the administration device and also because 1 mg was the smaller quantity of powder that could be weighed with exactitude using our analytical scale. Results presented in Figure 4 indicate that glucose levels dropped to similar values at 90 min following intratracheal administration of insulin-loaded (15%) microspheres obtained by both O₁/W/O₂ and SD techniques.

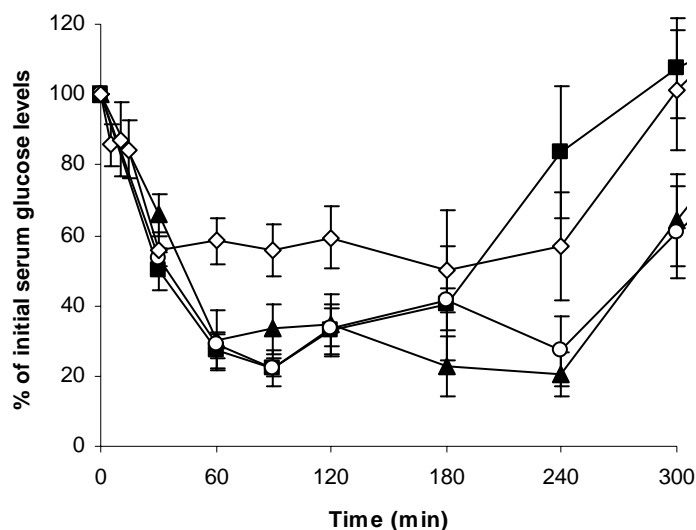


Fig. 4. Hypoglycaemic effect following intratracheal administration of (◇) an insulin solution in PBS pH 7.4; (▲) 750 µg of insulin loaded (15%) microspheres prepared by double O₁/W/O₂ emulsion/solvent evaporation technique; (■) 750 µg of insulin loaded (15%) microspheres prepared by spray-drying method and (○) 1500 µg of insulin loaded (7.5%) microspheres prepared by spray-drying method, to normal rats (insulin dose = 13.1 U/kg; results are mean ± S.E.M.; n = 5-6).

However, insulin-loaded O₁/W/O₂ (15%) microspheres induced a more prolonged hypoglycemic response, maintaining a reduction in the glucose levels of approximately 20% of the initial value until 240 min, whereas the rats receiving the insulin-loaded SD (15%) microspheres, had recovered 80% of their initial glucose levels by this time. Furthermore, as shown in Table 4, the time to reach the minimum blood glucose level (T_{\min}) was different for both O₁/W/O₂ (15%) and SD (15%) microspheres (240 min and 90 min, respectively).

Table 4. Pharmacodynamic parameters related to the hypoglycemic effects of insulin-loaded microspheres administered intratracheally^a (insulin dose: 13.1 U/kg)

Formulation	AAC _{→100%} × 10 ⁻³ (% min)	100-Glu _{min} (%)	T _{min} (min)
O ₁ /W/O ₂ (15%) ^b	20.8 ± 1.1	79.5	240
SD (15%) ^c	14.9 ± 2.2	78.0	90
SD (7.5%) ^d	19.9 ± 1.9	77.7	90

^a Results are expressed as the mean ± s.e.m.; AAC_{→100%}: Area above the serum glucose curve (until 100% of recovery); T_{min}: time to reach the minimum blood glucose levels; 100-Glu_{min} = 100-minimum percentage of glucose level at T_{min}; ^b O₁/W/O₂ microspheres (15% of insulin loading, 0.750 µg of powder); ^c Spray-dried microspheres (15% of insulin loading, 750 µg of powder), ^d Spray-dried microspheres (7.5 % of insulin loading, 1500 µg of powder).

Even though both formulations induced similar Glu_{min} values, their AAC_{→100%} were significantly different ($P < 0.05$). In addition, the AAC_{→100%} of insulin-loaded O₁/W/O₂ (15%) microspheres was significantly higher than the same dose of solution ($P < 0.05$). The serum glucose levels at different times following solution and powders administration are compared in Table 5.

Table 5. A comparison of serum glucose levels of formulations at different times^a (insulin dose:13.1U/kg)

Formulation	Serum glucose levels (%)		
	60 min	90 min	240 min
solution	58.4 ± 6.7	55.6 ± 7.4	56.7 ± 15.3
O ₁ /W/O ₂ (15%) ^a	30.1 ± 8.3*	33.3 ± 7.0*	20.5 ± 6.3***
SD (15%) ^b	27.1 ± 4.7*	21.9 ± 5.0*	83.6 ± 18.5**
SD (7.5%) ^c	28.7 ± 3.8*	22.3 ± 2.6*	27.1 ± 10.0***

^a Results are expressed as the mean ± s.e.m., ^a 15% insulin loaded CS microparticles prepared by emulsion/evaporation technique (750 µg of powder); ^b 15% insulin loaded CS microparticles prepared by spray-drying (750 µg of powder), ^c 7.5% insulin loaded CS microparticles prepared by spray-drying (1500 µg of powder); * $P < 0.05$ versus solution; ** $P < 0.05$ versus O₁/W/O₂ (15%) particles; *** $P < 0.05$ versus SD (15%) particles.

The glucose levels obtained 60 min and 90 min after administration of insulin-loaded O₁/W/O₂ (15%) and insulin-loaded SD (15%) microspheres were significantly lower than those obtained following administration of the solution, whereas at 240 min, the insulin-loaded O₁/W/O₂ (15%) formulation produced significantly lower glucose levels than the SD (15%) formulation.

To explain the differences in the hypoglycemic response between both 15% insulin loaded powders, it is essential to consider that deposition of particles in the different regions of the respiratory tract is influenced by various factors such as density and particle size (6,30). We assumed that densities of the insulin-loaded microspheres are similar to those of the corresponding blank ones. If only the densities were taken into account to explain their flight properties, both types of particles would equally reach deep sites of the lung. However, the aerodynamic particle size, which combines the density and the particle size, is more useful to describe the sites and the extent of particle deposition in the lung. If we consider the optimum aerodynamic particle size to be between 1 μm and 5 μm, it is possible that some quantity of the insulin-loaded O₁/W/O₂ (15%) microspheres, having a larger particle size ($5.98 \pm 3.35 \mu\text{m}$) (24) (obtained by optical microscopy) and consequently a larger theoretical aerodynamic particle size ($8.85 \pm 4.99 \mu\text{m}$), would not be able to reach the alveolar region. On the contrary, the insulin-loaded SD (15%) microspheres with $1.67 \pm 0.78 \mu\text{m}$ of particle size, were in the appropriate interval for alveolar deposition, with a theoretical aerodynamic particle size of $1.90 \pm 0.88 \mu\text{m}$. Nevertheless, despite this fact, a more prolonged hypoglycemic response was obtained with the larger insulin-loaded O₁/W/O₂ (15%) particles.

As regards the *in vitro* release pattern, the percentages of insulin released from insulin-loaded SD (15%) microspheres were higher (but not statistically different) than from insulin-loaded O₁/W/O₂ (15%) microspheres, throughout all the study [data not shown]. Therefore, the *in vitro* behavior does not offer a reasonable explanation for the differences in the reduction of the glucose levels, either.

Alternatively, differences in capture by alveolar macrophages, could explain our results. It is known that various physicochemical characteristics such as surface charge, hydrophilicity, concentration, composition and size, can determine the extent of the macrophages phagocytic function (31-33). We consider that particle size is probably the more important factor in determining differences in the phagocytosis of insulin-loaded O₁/W/O₂ (15%) and SD (15%) microspheres. Although there are some conflicting reports on the influence of the size of particulate carriers on the extent of phagocytosis (34,35), some authors have pointed out that the optimum size for microspheres phagocytosis is 1-2 µm (36,37). Makino et al. (37) studied the effect of the size on the polystyrene microspheres uptake by alveolar macrophages and found that the chemiluminescence intensity (parameter that correlate with internalized mass of particle) was greater for 1 µm microspheres than for 0.5 µm and 6 µm particles. In addition, those microspheres of 0.2 µm and 10 µm were not engulfed. Presumably, in our case, the insulin-loaded O₁/W/O₂ (15%) microspheres (approximately 6 µm) (24) were less effectively trapped by macrophages than the insulin-loaded SD (15%) microspheres (≈ 1.6 µm) thus could remain in the alveolar region releasing the insulin and hence, decreasing the glucose levels for a more prolonged time.

To evaluate the effect of microspheres concentration on the hypoglycemic response, insulin-loaded (7.5%) microspheres with similar particle size to those of insulin-loaded SD (15%) microspheres were prepared by the spray-drying method. In this case 1500 µg of powder were administered to keep the dose of 13.1U/kg constant. The pharmacodynamic parameters related to the hypoglycemic effects of these microspheres are also included in Table 4. As it can be observed in Figure 4, significantly lower glucose levels were found for rats treated with 1500 µg of the insulin-loaded SD (7.5%) microspheres compared to 750 µg of the insulin-loaded SD (15%) microspheres ($P < 0.05$), thus demonstrating that a prolonged response can be obtained by increasing the quantity of particles administered. With respect to this, Akhtar et al.(32) found (for 1-2 µm size microspheres), a gradual reduction in the macrophages uptake as the microspheres dose was increased from 1 to 20 mg/ml. This reduction was not linear, suggesting that the microsphere association or uptake by macrophages might be a saturable process. However, the

obtained hypoglycemic effect following administration of 1500 μg of the insulin-loaded SD (7.5%) microspheres were as low as those obtained with 750 μg the insulin-loaded $\text{O}_1/\text{W}/\text{O}_2$ (15%) microspheres. In fact, $\text{AAC}_{\rightarrow 100\%}$ values were similar, thus reaffirming that a prolonged response can also be obtained by increasing the particle size. Furthermore, taking into account the similarity in the hypoglycemic effects obtained with these two latter formulations having different chitosan concentration, we conclude that, at least in this range of concentrations, the CS had no effect on the increase of hypoglycemic response.

Lung distribution of microspheres

With the objective of obtaining an overview of the lung deposition of CS microspheres and explanation concerning their different *in vivo* behavior, FITC-BSA-loaded microspheres, prepared as indicated in the methodology section, were administered to rats. At different times, the rats were sacrificed and their lungs were viewed using confocal imaging. Although the particle size of FITC-BSA-loaded microspheres obtained by $\text{O}_1/\text{W}/\text{O}_2$ emulsion is different from that of the corresponding insulin loaded microspheres, we considered that the differences in size between FITC-BSA-loaded microspheres ($3.92 \pm 1.92 \mu\text{m}$ and $1.95 \pm 0.82 \mu\text{m}$ for emulsion and SD particles, respectively) were high enough to provide some information about the influence of the size on lung deposition and/or capture by alveolar macrophages.

For comparative purposes, the *in vivo* pulmonary disposition of FITC-BSA solutions was assessed by instillation into the rat lungs. Confocal images of alveoli 1hr and 2hr following instillation of 150 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ of protein indicate that the FITC-BSA was accumulated in the interstitium and that a great quantity of protein was captured by macrophages (Fig. 5a, 5b and 5c).

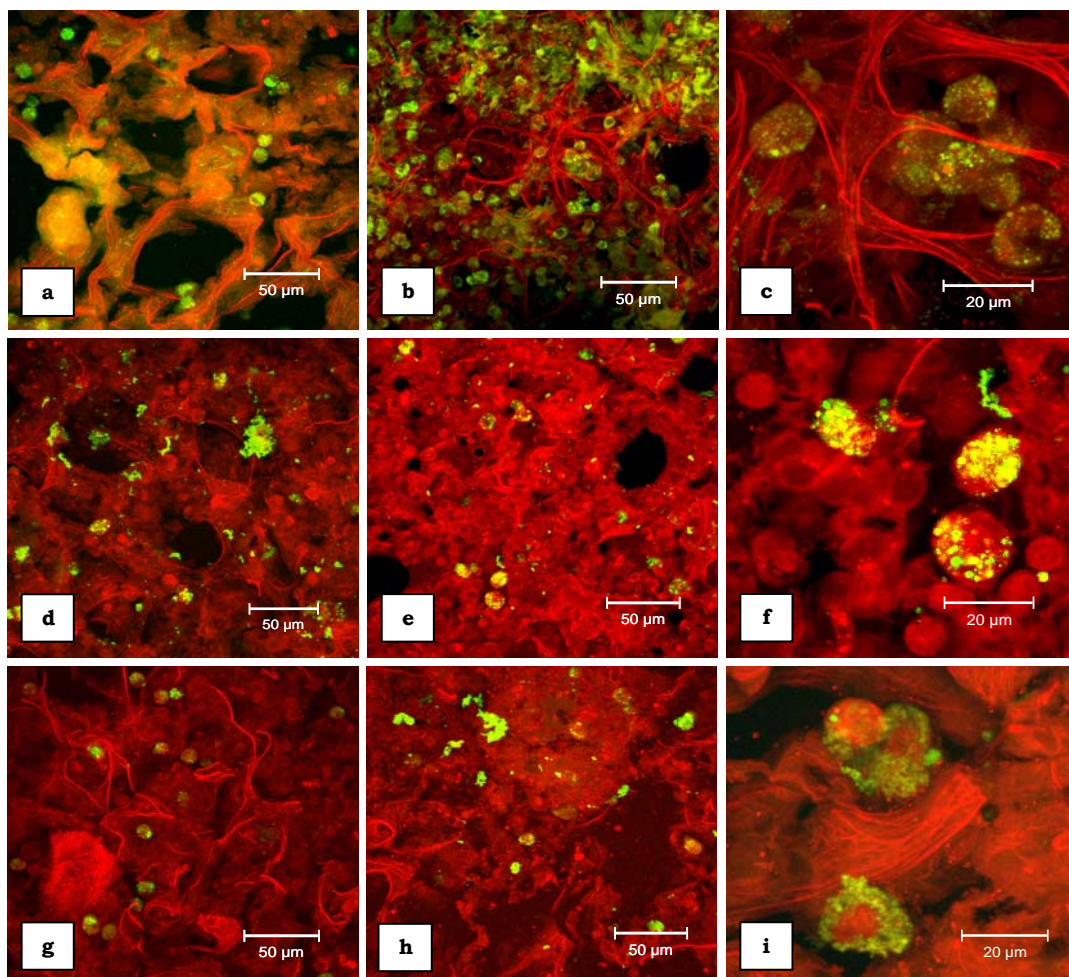


Fig. 5. Confocal fluorescence images of alveoli (a) 1 hr and (b, c) 2 hr after intratracheal instillation of a FITC-BSA solution; (d) 1 hr and (e, f) 2 hr after intratracheal administration of FITC-BSA loaded microspheres prepared by spray-drying method; (g) 1 hr and (h, i) 2 hr after intratracheal administration of FITC-BSA loaded microspheres prepared by double O₁/W/O₂ emulsion/solvent evaporation technique.

The presence of FITC-BSA in the interstitium after 2hr can be explained by the high molecular size of this protein (7 nm). Berg et al. (38) demonstrated that the rat alveolar epithelium contains two pore populations; small pores of 0.5 nm and large pores of 3.4 nm. The small pores occupy over 98% of the available pore area whereas the large pores comprise less than 2% of the total pore area.

Therefore, the diffusion of FITC-BSA through the alveolar epithelium is critically restricted.

Deposition of the microspheres in the alveolar region was confirmed following intratracheal administration of 750 μg of FITC-BSA-loaded CS microspheres. One hour following administration of FITC-BSA-loaded SD microspheres, macrophages had a very high quantity of particles attached to their surface or very close to them (see Fig. 5d). Apparently, 2hr after administration, these particles had almost completely been internalized by macrophages (Fig. 5e and 5f). On the contrary, at this time, macrophages had not internalized the $\text{O}_1/\text{W}/\text{O}_2$ microspheres, which appeared attached to the macrophages surface (Fig. 5h and 5i). Therefore, from a qualitative point of view, it seems that macrophages internalized FITC-BSA-loaded SD microspheres faster than FITC-BSA-loaded $\text{O}_1/\text{W}/\text{O}_2$ microspheres. This fact could probably be the result of the already commented differences in their particle size which could support our hypothesis about the influence of the particle size on the prolongation of the hypoglycemic effect, explained in the previous section. Results also show that no protein was found in the interstitium after 2 hr, as expected due to the very slow (24) or absence of release [data not shown] of FITC-BSA from microspheres obtained by $\text{O}_1/\text{W}/\text{O}_2$ and SD, respectively. FITC-BSA solution was captured more rapidly by macrophages than the particles. Similarly, Lombry et al. (25) found that the delivery of FITC-albumin as a solution, shortened the lag time for uptake by alveolar macrophages.

CONCLUSIONS

The present work demonstrates that chitosan microspheres prepared by both, double ($\text{O}_1/\text{W}/\text{O}_2$) emulsion/solvent evaporation and spray drying (SD) techniques, are adequate for lung protein delivery. They are able to reach the alveolar region following intratracheal administration to normal rats, with insulin-loaded $\text{O}_1/\text{W}/\text{O}_2$ particles inducing a significantly more prolonged hypoglycemic effect than the solution and insulin-loaded SD particles, which in this latter case can be explained by differences in particle size. Also, a higher amount of insulin-

loaded SD particles induces a more prolonged hypoglycemic effect than the lower amount of SD particles, for the same dose of insulin. In addition, capture of FITC-BSA-loaded O₁/W/O₂ particles by alveolar macrophages appears to be slower than that of FITC-BSA-loaded SD particles.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Spanish Government (CICYT, SAF 2002-03314). The Predoctoral fellowship to Carrión-Recio D. from the Vice-rectorship of Students and Institutional Relationships of the University of Santiago de Compostela is highly appreciated.

REFERENCES

1. V. Codrons, F. Vanderbist, R.K. Verbeeck, M. Arras, D. Lison, V. Preat, and R. Vanbever. Systemic delivery of parathyroid hormone (1-34) using inhalation dry powders in rats. *J. Pharm. Sci.* **92**:938-950 (2003).
2. H. Todo, H. Okamoto, K. Iida, and K. Danjo. Effect of additives on insulin absorption from intratracheally administered dry powders in rats. *Int. J. Pharm.* **220**:101-110 (2001).
3. Z. Shen, Q. Zhang, S. Wei, and T. Nagai. Proteolytic enzymes as a limitation for pulmonary absorption of insulin: in vitro and in vivo investigations. *Int. J. Pharm.* **192**:115-121 (1999).
4. J. Broadhead, S.K. Rouan, and C.T. Rhodes. The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **18**:1169-1206 (1992).
5. R. Vanbever, A. Ben-Jebria, J.D. Mintzes, R. Langer, and D.A. Edwards. Sustained release of insulin from insoluble inhaled particles. *Drug Dev. Research* **48**:178-185 (1999).
6. D.A. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hikach, A. Ben-Jebria, M.L. Eskew, J. Mintzes, D. Deaver, N. Lotan, and R. Langer. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science* **276**:1868-1871 (1997).
7. C.M Lehr, J.A.. Bouwstra, E.H. Schacht, and H.E. Junginger. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some natural polymers. *Int. J. Pharm.* **78**:43-48 (1992).
8. S. Hirano, H. Tsuchida, and N. Nagao. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials* **10**:574-576 (1989).

9. J. Knapczyc, L. Krówczyński, J. Krzck, M. Brzeki, E. Nirnberg, D. Schenk, and H. Struscyk. Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical applications. In: B. Skak-Braek, T. Anthonsen, and P. Sandford (eds), *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, Elsevier, London, 1989, pp. 657-663.
10. T.J. Aspden, J.D.T. Mason, N.S. Jones, J. Lowe, O. Skaugrud, and L. Illum. Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J. Pharm. Sci.* **86**:509-513 (1997).
11. S.I. Aiba. Studies on chitosan: relationship between N-acetyl group distribution pattern and chitinase digestibility of partially N-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.* **15**:241-245 (1993).
12. P. Artursson, T. Lindmark, S.S. Davis, and L. Illum. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* **11**:1358-1361 (1994).
13. N.G.M. Schipper, K.M. Vårum, and P. Artursson. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm. Res.* **13**:1686-1692 (1996).
14. N.G.M. Schipper, S. Olsson, J.A. Hoogstraate, A.G. deBoer, K.M. Vårum, and P. Artursson. Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res.* **14**:923-929 (1997).
15. A.F. Kotze, B.J. de Leeuw, H.L. Lueßen, A.g. de Boer, J.C. Verhoef, and Junginger HE. Chitosan for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* **159**:243-253 (1997).
16. A. Portero, C. Remuñán-López, and H.M. Nielsen. The potential of chitosan in enhancing peptide absorption across the TR146 cell culture model- an in vitro model of the buccal mucosa. *Pharm. Res.* **19**:169-174 (2002).
17. R. Fernández-Urrusuno, P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, and M.J. Alonso. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* **16**: 1576-1581 (1999).
18. P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, and M.J. Alonso. Novel hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* **63**:125-132 (1997).
19. P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, and M.J. Alonso. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.* **14**:1431-1436 (1997).
20. I. Behrens, A. Vila, M.J. Alonso, and T. Kissel. Comparative uptake studies of bioadhesive and non bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle absorption and transport. *Pharm. Res.* **19**:1185-1193 (2002).

21. H. Yamamoto, Y. Kuno, S. Sugimoto, H. Takeuchi, and Y. Kawashima. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J. Control. Release* **102**:373-381 (2005).
22. H. Takeuchi, H. Yamamoto, and Y. Kawashima. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**:39-54 (2001).
23. S.T. Lim, B. Forbes, G.P. Martin, and M.B. Brown. In vivo and in vitro characterization of novel microparticulates based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS Pharm. Sci. Tech* (on line computer file) **2**:4 (2001).
24. D. Carrión-Recio, J.L. Vila-Jato, and C. Remuñán-López. Development of a double emulsion-solvent evaporation method to produce chitosan microspheres for lung protein delivery. *Submitted to International Journal of Pharmaceutics*.
25. C. Lombry, C. Bosquillon, V. Préat, and R. Vanbever. Confocal imaging of rats lungs following intratracheal delivery of dry powders or solutions of fluorescent probes. *J. Control. Release* **83**:331-341 (2002).
26. F. Liu, Z. Shao, D.O. Kildsig, and A.K. Mitra. Pulmonary delivery of free and liposomal insulin. *Pharm. Res.* **10**:228-232 (1993).
27. R.M. Effross, and Mason GR. Measurements of pulmonary epithelial permeability in vivo. *Am. Rev. Respir. Dis.* **127**:S59-S66 (1983).
28. R.H. Hastings, M. Grady, T. Sakuma, and M.A. Matthay. Clearance of different-sized proteins in human cultured alveolar A 549 cell monolayer. *Pharm. Res.* **12**: 1115-1119 (1995).
29. S. Kobayashi, S. Kondo, and K. Juni. Permeability of peptides and proteins in human cultured alveolar A549 cell monolayer. *Pharm. Res.* **12**:1115-1119 (1995).
30. D.A. Edwards, A. Ben-Jebria, and Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J. Applied Physiol.* **85**:379-385 (1998).
31. Q. Zhang, G. Liao, D. Wei, and T. Nagai. Increase in gentamicin uptake by cultured mouse peritoneal macrophages and rat hepatocytes by its binding to polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **164**:21-27 (1998).
32. S. Akhtar, and K.J. Lewis. Antisense oligonucleotide delivery to cultured macrophages is improved by incorporation into sustained-release biodegradable polymer microspheres. *Int. J. Pharm. Sci.* **151**:57-67 (1997)
33. A.M. Torché, P. Le Corre, E. Albina, A. Jestin, and R. Le Verge. PLGA microspheres phagocytosis by pig alveolar macrophages: Influence of poly(vinyl alcohol), concentration, nature of loaded-protein and copolymer nature. *J. Drug Target* **7**:343-354 (2000).
34. T.M. Allen, G.A. Austin, A. Chonn, L. Lin, and K.C. Lee. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**:56-65 (1991).

35. G. Barrat, J.P. Tenu, A. Yapo, and J.F Petit. Preparation and characterization of liposome containing mannosylated phospholipids capable of targeting to macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **862**:153-164 (1986).
36. Y. Tabata, and Y. Ikada. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* **9**:356-362 (1988).
37. K. Makino, N. Yamamoto, K. Higuchi, N. Harada, H. Ohshima, and H. Terada. Phagocytic uptake of polystyrene microspheres by alveolar macrophages: effects of the size and surface properties of the microspheres. *Colloids Surf. B* **27**:33-39 (2003).
38. M.M. Berg, K.J. Kim, R.L. Lubman and E.D. Crandall. Hydrophilic solute transport across rat alveolar epithelium. *J. Appl. Physiol.* **66**:2320-2327 (1989).

Discusión general

DISCUSIÓN GENERAL

Con el objetivo de desarrollar sistemas microparticulares de distinta naturaleza y características destinados a la administración pulmonar de péptidos y proteínas, se prepararon microsferas hidrofílicas, utilizando el polisacárido quitosano (CS) y lipídicas a base de Dynasan® (tripalmitina). Para ello se pusieron a punto distintos procedimientos de microencapsulación [microsferas de CS: atomización (**Art. 1**) y doble emulsificación/evaporación del disolvente (**Art. 2**); microsferas de Dynasan®: simple o doble emulsificación/evaporación del disolvente (**Art. 3**)] y se investigó el efecto de diferentes variables de formulación y del proceso sobre las propiedades morfológicas y aerodinámicas de las microsferas. Asimismo, se investigó la capacidad de las microsferas de asociar insulina (IN) y albúmina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA), utilizados en este estudio como péptido y proteína modelo, respectivamente. Finalmente se evaluó *in vivo* la capacidad de las microsferas de CS de alcanzar y depositarse en la región alveolar y provocar un descenso en los niveles de glucosa, tras la administración intratraqueal a ratas de microsferas de CS conteniendo IN en forma de polvo seco.

Parte I. Preparación y caracterización *in vitro* de microsferas destinadas a la administración pulmonar de péptidos y proteínas

I.1. Producción de microsferas de quitosano mediante un procedimiento de atomización

La primera parte del trabajo experimental de esta tesis doctoral se centró en la obtención, utilizando la técnica de atomización, de microsferas de glutamato y acetato de CS que fueron caracterizadas *in vitro* en cuanto a sus propiedades

aerodinámicas. Las microsferas no fueron reticuladas con tripolifosfato pentasódico ni reacetiladas con anhídrido acético como habíamos propuesto anteriormente para microsferas de CS destinadas a la administración oral (Portero y col., 2002; Anal y col., 2005) debido a que se quería conservar la carga positiva del CS, responsable del efecto mucoadhesivo. Tampoco se esperaba la rápida disolución del CS en el pH del fluido del pulmón, con la consiguiente liberación inmediata de la macromolécula, por lo que tratamientos adicionales de insolubilización no se consideran necesarios. En las condiciones bajo las cuales se prepararon las microsferas se obtuvieron rendimientos de encapsulación mayores del 60% (sección de materiales y métodos del **Art. 1**).

Se investigó la capacidad de las microsferas de CS como vehículos de macromoléculas terapéuticas (IN, peso molecular = 5.7 KDa, punto isoelectrico = 5.3 y FITC-BSA, peso molecular = 69 KDa, punto isoelectrico = 4.6) utilizando dos procedimientos distintos. El primero de ellos consistió en la atomización de una disolución de CS al 1% (p/p) conteniendo la proteína terapéutica. En el segundo método, se prepararon microsferas blancas mediante atomización de la solución de CS al 1% (p/p) sin proteína que fueron posteriormente incubadas en disoluciones de las macromoléculas.

Debido a que con el primer método de encapsulación las macromoléculas IN y FITC-BSA tenían que ser previamente disueltas en disolventes apropiados (IN en hidróxido de sodio o HCL y FITC-BSA en agua), se estudió el efecto de la adición de los mismos sobre el tamaño y morfología de microsferas blancas de glutamato de CS. Ni la morfología ni el tamaño de las microsferas se vieron influenciados por el pH de la solución de CS ni por el tipo de sal de CS (**Figura 1** y **Tabla 1, Art. 1**). Las disoluciones preparadas a partir de los diferentes CS, con distintos pesos moleculares [CS base (para preparar las microsferas de acetato de CS) = 150 kDa, glutamato de CS = 300 kDa], presentan diferentes viscosidades. En consecuencia, en principio se podría esperar que se formasen gotículas más grandes a partir de la disolución del CS de mayor peso molecular (glutamato de CS) y, en definitiva, partículas mayores, resultando microsferas de mayor tamaño. Sin embargo, éstas presentaron un menor tamaño. Teniendo en cuenta que el

glutamato de CS se disolvió en agua y el CS base en ácido acético, es posible que el CS hinchase más a este pH ácido (Ginani y col., 1999; Orienti y col., 2002) ya que se sabe que a bajos pHs, los grupos amino del CS se protonan induciendo la repulsión electrostática entre los segmentos del polímero (Khalid y col., 2002) con la consiguiente expansión del gel.

Debido a que el tamaño adecuado para alcanzar un máximo depósito en las regiones más profundas del pulmón es de 1-5 μm (Vanbever y col., 1999), estas microsferas con diámetros aerodinámicos inferiores a 2.5 μm (calculados utilizando el Aerosizer®) y bajas densidades real y aparente, son candidatas para este propósito (**Tabla 2, Art. 1**).

Como se explicó anteriormente, las macromoléculas fueron incorporadas a las microsferas de CS utilizando dos procedimientos distintos. La determinación de la eficacia de encapsulación de IN a las microsferas de glutamato de CS producidas por el primer método, se realizó a 22°C para evitar la precipitación del péptido que podría ocurrir a temperaturas superiores (Reithmeier y col., 2001a). Sin embargo, sólo se pudo cuantificar el 80% de IN, lo cual sugiere que pudo ocurrir agregación. EL pH de la disolución atomizada de glutamato de CS conteniendo IN era de 5.61 (**Tabla 3, Art. 1**) en el cual el CS ($\text{pK}_a = 6.5$) presenta carga positiva mientras que la IN cargada negativamente, favoreciendo interacciones iónicas entre la IN y el CS, si bien tampoco se puede descartar una cierta precipitación de la IN (punto isoeléctrico = 5.3). Aunque en el caso de la FITC-BSA, la eficacia de encapsulación no pudo ser determinada, las interacciones iónicas también se ven favorecidas en el caso de la disolución de CS conteniendo la proteína (punto isoelectrico 4.6) ya que al pH de esta disolución (5.08) la FITC-BSA está cargada negativamente y el CS positivamente. El tamaño de partícula no dependió del tipo de molécula encapsulada, IN o FITC-BSA (**Tabla 3, Art. 1**)

La eficacia de encapsulación de IN a las microsferas de acetato de CS, también fue alta (> 80%), si bien al pH de la disolución de acetato de CS (3.5) ambos, CS e IN están cargados positivamente. Por lo tanto, como se ha sugerido previamente, otras fuerzas de interacción como uniones por puentes de hidrógeno

o interacciones hidrofóbicas, pueden tener lugar entre ambas especies (Fernández-Urrusuno y col., 1999). El tamaño de partícula para las microsferas blancas (2.14 μm) se vio influenciado por la cantidad de péptido incorporada (**Tabla 4, Art. 1**) si bien todas las partículas cargadas presentaron tamaños adecuados para administración pulmonar.

La morfología de las partículas fue similar, independientemente del tipo de CS acetato o glutamato utilizado o el tipo y concentración de la macromolécula incorporada (**Figuras 2 y 3, Art. 1**).

La liberación *in vitro* de IN a partir de las microsferas de glutamato de CS (15% p/p de carga teórica) fue rápida, con un 60% del péptido liberado a los 30 minutos (**Figura 4, Art. 1**). A partir de los 60 min., la liberación disminuye, probablemente debido a una agregación del péptido. Por el contrario, la FITC-BSA no se detectó durante el proceso de liberación, por lo que no fue posible obtener su curva de liberación. Las diferencias en la liberación entre ambas moléculas podrían explicarse en primer lugar por el coeficiente de difusión acuoso de una molécula que varía de manera inversa con su peso molecular (Polson, 1950). De este modo, es posible que la difusión de la molécula de FITC-BSA (con un mayor peso molecular que la IN) a través de la matriz de CS, se haya visto dificultada. En los hidrogeles, los espacios disponibles para la difusión a través de la malla que forma el gel, cambia entre los estados colapsado e hinchado, lo cual permite la diferenciación de péptidos y proteínas en función del tamaño (Peppas, 1997). Debido a que el hinchamiento del CS se ve reducido al pH 7.4, en el que se realizaron los estudios de liberación *in vitro*, es posible que la FITC-BSA (7.2 nm) no haya podido difundir a través de los pequeños espacios disponibles, en esas condiciones, en el gel de CS. En contraste, este proceso pudo ser más fácil para la IN, cuyo diámetro molecular es de 2.2 nm.

Los perfiles de liberación de IN desde las microsferas de acetato de CS, con diferentes contenidos teóricos del péptido muestran que la velocidad de liberación para la carga del 2% (p/p) teórico de IN fue lenta con sólo un 40% liberado a las 8 horas, mientras que para las microsferas con cargas de 12% y 24% de IN, se

alcanzaba el mismo el mismo porcentaje liberado a los 30 minutos (**Figura 5, Art. 1**). Al igual que para las microsferas de glutamato de CS, para las microsferas de acetato de CS se observó un descenso en la cantidad de IN liberada, en este caso tras 4 horas, que también se explicaría por la agregación del péptido.

Antes de proceder a la asociación de la IN a las microsferas blancas de acetato de CS, se investigó la incubación de las mismas en diferentes disolventes como acetona, etanol y metanol (sin el péptido, con el fin de elegir el disolvente más adecuado). Se concluyó que la incubación de las microsferas en tampón fosfato salino (PBS) 7.4 y su mezcla con metanol, no modificaban ni el tamaño, ni la morfología (**Fig. 6, Art. 1**), ni la dispersión de las partículas durante el experimento. La incubación de la microsferas en el medio conteniendo IN tampoco tuvo efecto negativo sobre las propiedades morfológicas de las mismas (**Fig. 7, Art. 1**). La eficacia de asociación de IN a las microsferas de acetato de CS aumentaba con el incremento de la concentración del péptido en disolución, obteniéndose valores próximos al 90% para la mayor concentración (**Tabla 6; Art.1**). Esta mayor asociación está relacionada con la mayor cantidad de grupos carboxilos de la proteína susceptibles de interacción con los grupos amino del CS.

La incubación de las microsferas de glutamato de CS en disoluciones de IN y FITC-BSA (0.9 mg/mL, durante 30 min.) dio lugar a una asociación del 100% de FITC-BSA a la superficie de las microsferas, mientras que ésta fue del 36.53-52.44% para la IN (**Tabla 7, Art. 1**). Debido a que estos estudios se realizaron a pH 7.4, en el cual ambas macromoléculas están cargadas negativamente y los grupos amino del CS no están ionizados, se reafirman las hipótesis previamente propuestas de la existencia de interacciones no sólo de tipo electrostática sino también por enlaces por puente de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas entre las proteínas IN y albúmina (BSA) y el CS (Calvo y col., 1997; Fernández-Urrusuno y col., 1999). En nuestro caso, se obtuvo una mayor asociación de FITC-BSA al CS, sugiriendo una interacción más fuerte de esta proteína con el CS.

Las diferencias en cuanto a eficacia de asociación de IN a las microsferas de glutamato y acetato de CS (ver **Tablas 6 y 7, Art. 1**) se pueden atribuir a las

diferencias anteriormente mencionadas en el hinchamiento de los diferentes tipos de CS en los diversos medios de incubación. Los perfiles de liberación *in vitro* de IN a partir de las microsferas de acetato de CS muestran que la velocidad de liberación disminuye al aumentar el contenido de IN, lo que podría indicar que la IN se localiza en su mayor parte en la superficie de las microsferas (**Fig. 8, Art. 1**). Así, se encontró un 70% liberado al cabo de 1 hora, para la formulación conteniendo un 0.9% p/p del péptido.

1.2. Producción de microsferas de quitosano utilizando una técnica de doble emulsificación aceite-en-agua-en-aceite (O₁/W/O₂)/ evaporación del disolvente

Se puso a punto una nueva técnica de doble (O₁/W/O₂) emulsificación/evaporación del disolvente y se utilizaron diferentes disolventes orgánicos como fase orgánica interna (O₁), diferentes soluciones acuosas de CS al 1% como fase acuosa (W) y aceite de algodón (conteniendo Span 85 al 0.1%) como fase externa oleosa (O₂). Este procedimiento permitió obtener microsferas con tamaños adecuados para administración pulmonar. El método de doble emulsión fue seleccionado con el objetivo, en principio, de obtener microsferas porosas y/o de baja densidad. Partíamos de la hipótesis de que el disolvente orgánico de la fase interna (fase O₁) en su difusión hacia la fase externa (O₂) previamente a su evaporación, atravesaría la fase acuosa (W) consistente en una disolución de CS, con la consiguiente formación de poros en las microsferas de CS a medida que precipita el polímero, dando lugar, en definitiva, a estructuras porosas e irregulares.

Es sabido que la velocidad de emulsificación, viscosidad de la fase interna, concentración de tensoactivo y relación de volúmenes fase interna/fase externa son factores clave que influyen sobre el tamaño y la morfología de las partículas producidas por técnicas de emulsificación/evaporación del disolvente. En la primera parte de este apartado se investigó el efecto de diferentes variables como el tipo de fase orgánica interna (O₁), fase acuosa (W) y velocidad de agitación, sobre la morfología y el tamaño de las microsferas de CS. Además, se investigó la

capacidad de estas microsferas de asociar y liberar macromoléculas terapéuticas como la IN y la FITC-BSA.

En cuanto al efecto del tipo de fase O_1 , se investigó la emulsificación de cuatro disolventes (diclorometano, acetato de etilo, tolueno y n-hexano) en la fase acuosa, manteniendo constante ésta (disolución de CS al 1% p/p en agua) y la velocidad de agitación de 500 rpm. Estos disolventes se seleccionaron debido a su inmiscibilidad con el agua y miscibilidad con la fase externa aceite de algodón (Bodmeier y col., 1994). Los resultados mostraron que la superficie y morfología de las microsferas se encuentran muy influenciadas por el tipo de fase O_1 . De hecho, las microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) muestran que aquellas partículas obtenidas con acetato de etilo y principalmente n-hexano y tolueno presentan una superficie muy irregular y una estructura aparentemente no densa (**Figura 1, Art. 2**). Por el contrario, cuando se utiliza diclorometano se obtienen microsferas esféricas y rugosas con tamaños comprendidos entre 1 y 15 μm . Las diferencias encontradas en la morfología (textura) de las distintas microsferas pueden ser el resultado de diferencias en la velocidad de difusión del disolvente hacia el aceite de algodón, que está determinada por el grado de miscibilidad o solubilidad. De acuerdo con la constante dieléctrica (CD), parámetro indicativo de la solubilidad, las superficies más rugosas son obtenidas con los disolventes más apolares como n-hexano (CD=1.9) y tolueno (CD=2.4). En cambio, el acetato de etilo y el diclorometano tienen una polaridad relativamente mayor (CD = 6 y 9.1 respectivamente), dando lugar a partículas con una superficie comparativamente menos rugosa. El diclorometano fue seleccionado para llevar a cabo los siguientes estudios debido al menor tamaño de las partículas obtenido con el mismo ($6.45 \pm 3.42 \mu\text{m}$).

Una vez identificados los disolventes más adecuados para la preparación de las microsferas, se decidió producir una mayor cantidad de partículas, para lo que se aumentaron de manera proporcional los volúmenes de las diferentes fases. En consecuencia hubo que reajustar las condiciones de emulsificación. Para ello, se evaluó el efecto de la velocidad de agitación (500 y 750 rpm) sobre el tamaño y morfología de las partículas preparadas utilizando diclorometano como fase O_1 ,

comprobándose que el tamaño medio y la desviación estándar de las partículas se encuentran significativamente influenciados por la velocidad de agitación utilizada ($P < 0.05$, **Tabla 1** y **Figura 3, Art. 2**). Esto se debe a que una velocidad elevada de agitación favorece la formación de emulsiones finas y evita la aglomeración de las gotículas que, a su vez, dan lugar a la formación de microsferas pequeñas, aumentando, en consecuencia, la homogeneidad de la distribución del tamaño de partícula (Mateovic y col., 2002). Se seleccionó la velocidad de agitación de 750 rpm para realizar los siguientes estudios debido a que con ella se obtuvieron microsferas adecuadas para administración pulmonar.

El siguiente objetivo del trabajo fue investigar la capacidad de estas microsferas para asociar y liberar IN y FITC-BSA, seleccionadas como moléculas peptídica y proteica modelo, respectivamente, que fueron disueltas en un disolvente adecuado previamente a su incorporación a la disolución de CS (fase W). Teniendo en cuenta que la IN se disuelve bien en HCL 0.1N ($\text{pH} = 1.1$) y en NaOH 0.01N ($\text{pH} = 12.1$) y que la FITC-BSA se solubiliza en tampón fosfato sódico (PBS) 7.4 y en agua ($\text{pH} = 6.16$), se investigó el efecto de la incorporación de estos disolventes en la fase W, sobre el tamaño de partícula de las microsferas blancas sin principio activo. El pH de la fase acuosa resultante no fue ajustado, por lo que cada disolvente originó una disolución de CS de diferente pH. Los resultados obtenidos indican que el tamaño de partícula está fuertemente influenciado por el pH de la solución de CS (**Tabla 2, Figuras 5 y 6, Art. 2**). Así, la inclusión de HCL 0.1N en la fase acuosa, produjo microsferas esféricas con un tamaño de partícula ($18 \mu\text{m}$) significativamente mayor ($P < 0.05$) al de los obtenidos con los disolventes más básicos H_2O , PBS 7.4 o NaOH 0.01N y, en consecuencia, no apropiado para administración pulmonar. Estos resultados se pueden explicar teniendo en cuenta que el CS hincha en gran medida a pH ácido (2.0) (Oriente y col., 2002; Ginani y col., 1999), por lo que la disolución de CS conteniendo HCL daría lugar a gotículas y microsferas de mayor tamaño. Consecuentemente, el disolvente seleccionado para disolver la IN fue NaOH 0.01N, con el que se obtuvieron microsferas de aproximadamente $6 \mu\text{m}$, mientras que el H_2O fue considerado el disolvente más apropiado para la FITC-BSA ya que dio lugar a tamaños de partícula de aproximadamente $4 \mu\text{m}$ y una distribución de tamaño más homogénea que la obtenida para las microsferas

utilizando el PBS pH 7.4. Las partículas blancas obtenidas utilizando NaOH y H₂O, presentan propiedades aerodinámicas adecuadas para administración pulmonar (**Tabla 3, Art. 2**).

Los resultados de eficacia de encapsulación de IN y FITC-BSA son similares a los obtenidos para las microsferas producidas por atomización de una solución polimérica conteniendo la proteína a encapsular. En el caso de las microsferas conteniendo IN, los estudios de eficacia de asociación fueron llevados a cabo a 22°C para evitar los fenómenos de agregación descritos para esta proteína a altas temperaturas, ya comentados (Reithmeier y col., 2001a). Aunque sólo un 80% (p/p) de la IN pudo ser cuantificada, rechazamos la hipótesis de que la IN pudiera haber difundido hacia la fase oleosa externa durante el proceso de formación de las microsferas, debido a la insolubilidad del péptido en el aceite. No obstante, no podemos descartar que haya podido ocurrir agregación de la proteína o adsorción a superficies. A pesar de todo esto, consideramos que esta eficacia de encapsulación es suficientemente elevada. Por otro lado, la encapsulación de FITC-BSA fue excelente, con valores del 100 %. Como se explicó anteriormente en el apartado I.1, se han encontrado elevados niveles de asociación entre la IN o la BSA y el CS, tanto a pHs a los cuales la proteína y el CS tienen cargas opuestas, como a aquellos en los cuales ambas especies presentan el mismo tipo de cargas, lo cual sugiere que entre la proteína y el CS no sólo tienen lugar interacciones electrostáticas sino también interacciones hidrofóbicas o por puentes de hidrógeno (Calvo y col., 1997; Fernández-Urrusano y col., 1999). En nuestro caso, la encapsulación de FITC-BSA fue mayor, sugiriendo una mayor interacción entre esta proteína y el CS.

La liberación de la IN a partir de las microsferas de CS producidas por emulsificación/evaporación del disolvente es rápida, cediéndose un 42% a los 15 min (**Figuras 7 y 8, Art. 2**). Al pH 7.4 utilizado para investigar el comportamiento de liberación de las microsferas, la ausencia de ionización de los grupos amino del CS y la carga negativa del péptido da lugar a la disociación entre la IN y el CS y a una rápida cesión del péptido. La disminución de la concentración de IN a los 90 min., puede explicarse por los fenómenos de agregación o adsorción a superficies

antes descritos. Las interacciones más fuertes existentes entre la FITC-BSA y el CS, previamente explicadas, pueden ser el origen de la liberación más lenta de la FITC-BSA desde las microsferas, así como el mayor peso molecular de la FITC-BSA, que dificultaría su difusión a través de la matriz de CS (Polson, 1950; Peppas, 1997).

1.3. Preparación de microsferas lipídicas mediante técnicas de emulsificación/evaporación del disolvente

Preparamos microsferas de naturaleza lipídica utilizando materiales como triglicéridos (tripalmitina, Dynasan[®] 114, 116 y 118) y colesterol. Para ello utilizamos, un método de simple (W/O) emulsificación/evaporación del disolvente puesto a punto por nosotros y el método de doble ($W_1/O/W_2$) emulsificación/evaporación del disolvente propuesto por Reithmeier y col (Reithmeier 2001a, 2001b) de doble, que modificamos con la finalidad de obtener microsferas con tamaños adecuados para administración pulmonar. Como hemos comentado previamente, son numerosos los factores que influyen sobre el tamaño y la morfología de las partículas producidas por las técnicas de emulsificación/evaporación del disolvente. Nosotros nos propusimos identificar las condiciones que permitían la producción de microsferas aptas para nuestros propósitos. Asimismo, investigamos la capacidad de estas microsferas de asociar y liberar la proteína modelo FITC-BSA.

Procedimiento de simple (O/W) emulsificación/evaporación del disolvente

En este procedimiento el lípido se disolvió en diclorometano para formar la fase orgánica (O), la cual se adicionó sobre una fase acuosa (W) formada por agua conteniendo polivinil alcohol (PVA, 1% p/p) y la mezcla se mantuvo en agitación para formar una simple emulsión (O/W). Se evaluó el efecto del sistema utilizado para emulsificar y la velocidad de emulsificación, la velocidad de agitación y la concentración y el tipo de lípido sobre el tamaño y la morfología de las microsferas. Los resultados correspondientes a las formulaciones preparadas utilizando el mezclador vortex (2400 rpm, *Heidolph REAX 2000*) como sistema de emulsificación, indican que la variación de la concentración de lípido de la fase O, de 300 a 150 mg/mL no influyó sobre el tamaño de partícula, cuando se utilizaba

750 rpm como velocidad de agitación (del agitador de hélice) ($P < 0.05$, **Tabla 1, Art. 3**). Sin embargo, utilizando la velocidad de agitación de 1000 rpm, una disminución de la concentración de lípido desde 300 mg/mL hasta 75 mg/mL condujo a la obtención de microsferas con tamaños de partícula significativamente más pequeños ($P < 0.05$). Es sabido que en una emulsión de dos fases sometida a una adecuada agitación, las gotas experimentan continuas colisiones entre ellas, coalesciendo y separándose nuevamente y que aquellas gotas con mayor viscosidad tienen una mayor tendencia a la coalescencia que a la separación (Arshady, 1991). Teóricamente, una disminución en la concentración de lípidos conlleva a una disminución en la viscosidad de la fase O interna, disminuyendo a su vez la probabilidad de coalescencia de las gotas de la emulsión con la consiguiente formación de partículas más pequeñas. En este trabajo, no determinamos experimentalmente las viscosidades de las disoluciones constitutivas de las fases internas de las emulsiones. Sin embargo, es probable que la disolución de 75 mg/mL presente una viscosidad lo suficientemente baja como para generar gotículas y, posteriormente, partículas más pequeñas que las otras concentraciones investigadas.

El tamaño de partícula tampoco se vio significativamente influenciado ($P < 0.05$) por un aumento de la velocidad de agitación desde 750 rpm a 1000 rpm para una concentración de 300 mg/mL de lípido (**Tabla 1, Art. 3**). Generalmente, un incremento de la velocidad de agitación produce gotas y, consecuentemente, partículas más pequeñas (Gabor y col., 1999; Chen y col., 1999). En nuestro caso, mezclando la fase interna orgánica con un pequeño volumen de la fase externa acuosa se obtuvo una emulsión inicial que fue posteriormente vertida sobre un volumen mayor de fase externa acuosa en baño de hielo y sometida a agitación (750 ó 1000 rpm) continua hasta la formación de las partículas. Con ánimo de estandarizar la técnica, mantuvimos el proceso durante un tiempo de 1h. Sin embargo, consideramos que debido a la rápida evaporación del diclorometano y a la baja temperatura de la fase externa, la solidificación del lípido comienza inmediatamente, por lo que el efecto de la velocidad de agitación pasa a ser despreciable. En consecuencia, el tamaño de partícula vendría determinado por el tamaño que tienen las gotas de la emulsión inicial obtenida con el mezclador

vortex (antes de adicionarlas sobre la fase externa en baño de hielo) y no por la velocidad de agitación de la emulsión final. Esto permitiría explicar porqué las dos velocidades de agitación utilizadas, produjeron partículas de tamaño similar. Las fotografías obtenidas por SEM (**Figura 1, Art. 3**) revelan que las microsferas tienen una similar apariencia porosa externa independientemente de la velocidad de agitación y de la concentración de lípido utilizadas. La formación de poros en estas partículas podría ser explicada por la rápida solidificación del lípido. En cuanto se produce la precipitación del lípido en la superficie de la gota, el disolvente orgánico aún presente dentro de la gota, difunde hacia la fase acuosa externa, provocando la formación de poros (Bodmeier y col., 1991).

Debido a que utilizando el mezclador vortex, independientemente de la concentración de lípido en la emulsión y de la velocidad de agitación, se obtenían microsferas de aproximadamente 33-43 μm , que resultaban inadecuadas para administración pulmonar, decidimos cambiar este sistema de emulsificación por el homogeneizador (*Heidolph DIAX 600*), el cual genera velocidades mucho mayores. Este sistema de emulsificación sí permitió la obtención de partículas con pequeños tamaños ($\approx 2.58 \mu\text{m}$ a $3.3 \mu\text{m}$) (**Tabla 2, Art. 3**). Además, se comprobó que variando la velocidad de homogeneización, se podía modificar significativamente el tamaño de partícula. Así, la velocidad de 20500 rpm producía partículas de colesterol y Dynasan® 118 significativamente más pequeñas que cuando se utilizaba la velocidad de 13500 rpm ($P < 0.05$). Además, para la primera de las velocidades, los lípidos Dynasan® 114 y 116 daban lugar a partículas mayores que las obtenidas utilizando Dynasan® 118 y colesterol ($P < 0.05$, **Tabla 2, Art. 3**), probablemente debido a diferencias en las viscosidades de sus disoluciones en diclorometano.

Método de doble ($W_1/O/W_2$) emulsificación/evaporación del disolvente

Esta técnica de doble emulsión ($W_1/O/W_2$) fue empleada con el fin de incrementar la porosidad de la superficie de las partículas y así reducir su densidad y de facilitar la posterior encapsulación de la macromolécula terapéutica modelo, soluble en agua. Las microsferas obtenidas por el método propuesto por

Reithmeier y col. (Reithmeier y col., 2001a, 2001b) presentaban tamaños muy grandes (57-100 μm) no apropiados para liberación pulmonar por lo que nos propusimos modificar el método con el objetivo de obtener microsferas de pequeños tamaño. El lípido seleccionado para llevar a cabo este estudio fue el Dynasan® 116. La hipótesis de partida era que a la vez que el disolvente de la fase O difunde hacia la fase externa acuosa (W_2) para evaporarse, provocando la solidificación del lípido, difundiría también el disolvente acuoso interno (fase W_1) abriéndose paso a través del lípido, causando la aparición de una elevada cantidad de poros en la matriz lipídica y, en consecuencia, dando lugar a estructuras muy porosas (Nihant y col., 1994).

Se emplearon dos métodos para obtener las emulsiones finales. En el primero de ellos, se utilizó el vortex para formar la primera y la segunda emulsión. En el segundo método, para obtener la primera emulsión se utilizó el sonicador y la segunda se formó con ayuda del homogeneizador. Se observó una gran reducción del tamaño de partícula de las microsferas preparadas por el segundo procedimiento con respecto a aquellas obtenidas utilizando el mezclador vortex (**Tablas 3 y 4, Art. 3**), obteniéndose partículas con el tamaño lo suficientemente pequeño (aproxim. 2.77 μm a 3.01 μm) para ser administradas por vía pulmonar. En este caso se evaluó la utilización de tres fases acuosas (W_1) distintas (H_2O , solución de CS al 1% (p/p) y solución de PBS pH = 7.4) y se obtuvieron partículas con morfologías y tamaños similares ($P < 0.05$, **Tabla 4, Figuras 4 y 5, Art. 3**).

Las microsferas obtenidas tanto a partir de una emulsión simple como doble, utilizando el homogeneizador o sonicador/homogeneizador, respectivamente, presentan propiedades aerodinámicas adecuadas para administración pulmonar (**Tablas 5 y 6, Art. 3**).

Se investigó la capacidad de las microsferas obtenidas por doble emulsificación/evaporación del disolvente como vehículos de proteínas, utilizando la FITC-BSA albúmina como molécula modelo. Para su asociación, la proteína fue disuelta en PBS 7.4 (fase W_1). Se obtuvieron microsferas con similar apariencia (**Figura 5, Art. 3**) y tamaño ($2.79 \pm 1.08 \mu\text{m}$) que las correspondientes blancas. La eficacia de encapsulación obtenida fue del $61.56 \pm 1.36\%$. Se sabe que los

procedimientos de doble emulsificación $W_1/O/W_2$ pueden dar lugar a bajos niveles de asociación de proteínas hidrofílicas, debido a la partición de las mismas hacia la fase externa acuosa (Chen y col., 2002). No obstante, como se recoge en la Metodología del Artículo 3, en nuestro procedimiento, el pH de la fase externa acuosa fue igualado al punto isoelectrico de la FITC-BSA con el fin de minimizar el escape de la misma hacia la fase externa. Además, la estabilidad de la emulsión primaria W/O es un requisito indispensable para estabilizar la emulsión múltiple y conseguir una elevada asociación de principio activo dentro de la micropartícula (Nihant y col., 1994). Aunque en nuestro caso la estabilidad de la emulsión W/O fue mejorada con el uso de la sonicación en comparación con el sistema mezclador vortex, observamos que la fase acuosa todavía tenía tendencia a coalescer, por lo que no descartamos que se pudiera producir la fuga de una parte de la proteína hacia la fase externa. Esto explicaría el no haber obtenido un porcentaje mayor de encapsulación.

El perfil de liberación *in vitro* de la FITC-BSA a partir de las microsferas de Dynasan® (**Figura 6, Art. 3**) muestra que sólo el 20% de la proteína es liberada al cabo de 8 h. Esta lenta cesión pudiera explicarse por la adsorción de la proteína a la superficie de las micropartículas, fenómeno que ha sido descrito entre moléculas como la somatostatina o albúmina carboximetilada y microsferas de Dynasan® y de ácido poliláctico glicólico (PLGA), respectivamente (Crotts y col., 1997; Reithmeier y col., 2001b).

Determinación de las propiedades aerodinámicas de las microsferas de quitosano y lipídicas: Selección de las formulaciones de microsferas a investigar in vivo.

Un aspecto crucial a la hora de seleccionar las formulaciones de microsferas más adecuadas para su administración pulmonar, fue investigar "*in vitro*" su comportamiento aerodinámico. Para ello se utilizó el equipo Aerosizer® con el Aerodisperser® acoplado, el cual provee una buena dispersión de partículas por un proceso de desaglomeración controlado. El máximo depósito de partículas en las regiones más profundas del pulmón ocurre para aquellas con diámetros aerodinámicos de entre 1 y 5 μm . En consecuencia, a partir de los resultados recogidos en la **Tabla 2** del **Art. 1**, **Tabla 3** del **Art. 2** y en las **Tablas 5** y **6** del

Art. 3 se confirma que todas las formulaciones de CS y lipídicas que habían sido previamente seleccionadas para su caracterización aerodinámica, se consideran adecuadas para deposición en las partes más profundas del pulmón, con diámetros aerodinámicos menores de 5 μm . Asimismo, sus densidades aparentes ($< 0.53 \text{ g/cm}^3$), garantizarán la llegada a esta región.

Las microsferas lipídicas preparadas por nosotros, mostraban una gran tendencia a la agregación, deformándose algunas de ellas fácilmente al manipularlas. Esto dificultó su administración intratraqueal a ratas como polvo seco, utilizando el método puesto a punto por nosotros en esta Tesis para la administración *in vivo* de las partículas (recogido en el **Art.4**). Como consecuencia, decidimos centrarnos exclusivamente en la investigación *in vivo* de las microsferas de CS. Para ellos seleccionamos aquellas que se muestran en la **Tabla 3** del **Art. 1** y las que contienen las proteínas que se recogen en la **Tabla 2** del **Art. 2**. En la **Tabla 1** del **Art. 3**, también se detallan con claridad las microsferas estudiadas *in vivo*.

Parte II. Evaluación *in vivo* de las microsferas de quitosano destinadas a la administración pulmonar de péptidos y proteínas

El objetivo de este trabajo fue investigar *in vivo* la aplicación de las microsferas de CS, producidas por las técnicas de doble emulsificación ($\text{O}_1/\text{W}/\text{O}_2$)/evaporación del disolvente y atomización (seleccionadas a partir de los estudios recogidos en las **Partes I.1** y **I.2** de esta memoria), como vehículos para la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas.

Se llevaron a cabo dos tipos de estudios: (1) *Evaluación del efecto hipoglucémico tras la administración a ratas normales de microsferas de CS conteniendo insulina* y (2) *Determinación de la distribución en el tejido pulmonar de las microsferas de CS conteniendo FITC-BSA, utilizando una técnica de microscopía confocal*.

Evaluación del efecto hipoglucémico tras la administración a ratas normales de microsferas de quitosano conteniendo insulina

Antes de proceder a la realización de este estudio, que se recoge en el **Artículo 4 (Parte II.3)**, y para determinar las condiciones óptimas de administración intratraqueal a las ratas de las formulaciones conteniendo IN, llevamos a cabo una serie de ensayos preliminares (**Parte II.1**) que nos permitieron concluir que las ratas no debían ser sometidas a condiciones de ayunas durante la noche anterior a la realización del estudio y que no debían tener acceso a alimentos durante la realización del mismo.

Los protocolos de administración y de evaluación farmacodinámica de las microsferas de CS y las soluciones de IN, utilizadas como control, se recogen en la Metodología del **Art.4**. La respuesta farmacodinámica fue evaluada midiendo las concentraciones de glucosa sérica tras la administración por vía intratraqueal de las mencionadas formulaciones a ratas. Se ensayaron las microsferas obtenidas por el método de doble emulsificación/evaporación del disolvente conteniendo un 15% (p/p) de IN o FITC-BSA y microsferas obtenidas por atomización conteniendo un 7.5% (p/p) y un 15% (p/p) de IN o un 15% (p/p) de FITC-BSA (**Tabla 1, Art. 4**).

En primer lugar, se administraron disoluciones conteniendo distintas dosis de IN y se comprobó que a medida que aumentaba la dosis, aumentaba el efecto hipoglucémico de la IN, así como el tiempo necesario para recuperar los niveles iniciales de glucosa y se prolongaba el efecto (**Figura 2, Art. 4**). Los resultados del análisis estadístico muestran que hubo diferencia significativa en cuanto al área sobre la curva de los niveles de glucosa hasta 100% de recuperación ($AAC_{\rightarrow 100\%}$) entre la dosis de 27.4 U/kg y las de 17.9 U/Kg, 13.1 U/Kg y 7.4 U/Kg y entre la de 17.9 U/kg y 13.1 U/kg ($P < 0.05$, **Tabla 3, (Art. 4)**). Por el contrario, no se encontró diferencia significativa entre las dosis de 7.4 U/kg y 13.1 U/kg. La mayor reducción de los niveles de glucosa ($100-Glu_{min}$) se produjo con la dosis mayor. Sin embargo, el tiempo necesario para alcanzar los niveles mínimos de glucosa (T_{min}) fue similar para las 3 dosis más elevadas. Es importante resaltar que el $AAC_{\rightarrow 100\%}$, indicativo de la disminución de los niveles de

glucosa, es directamente proporcional a la dosis utilizada de IN ($r^2 = 0.997$) (**Figura 3, Art. 4**), lo que resulta muy interesante desde el punto de vista predictivo.

A partir de estos resultados y teniendo en cuenta otros aspectos de tipo práctico, se seleccionó la dosis de 13.1 U/kg de IN para evaluar el comportamiento *in vivo* de las microsferas. Para investigar *la influencia del método de preparación de las partículas* sobre el efecto hipoglucémico de las mismas, se determinaron los niveles de glucosa tras la administración intratraqueal a ratas de 0.750 μ g de dos formulaciones de microsferas de CS conteniendo 15% (p/p) de IN, preparadas utilizando las técnica de doble ($O_1/W/O_2$) emulsificación/evaporación del disolvente y atomización. De la comparación de las correspondientes curvas de glucemia se puede concluir que los niveles de glucosa descienden, a los 90 min., hasta valores similares para ambas formulaciones (**Figura 4, Art. 4**). Sin embargo, las microsferas obtenidas por emulsificación inducen una respuesta hipoglucémica más prolongada, manteniendo durante 240 min. una reducción de aproximadamente un 80% del nivel inicial de glucosa; mientras que, al cabo de este tiempo, las ratas a las que se administró las microsferas producidas por atomización, ya habían recuperado el 80% del nivel inicial de glucosa. Ambas formulaciones indujeron similares valores de Glu_{min} , si bien éstos se alcanzan a distintos tiempos (T_{min} microsferas doble emulsificación = 240 min., T_{min} microsferas atomización = 90 min.). Además, el $AAC_{\rightarrow 100\%}$ de las microsferas obtenidas por emulsificación es significativamente superior ($P < 0.05$) al de las partículas producidas por atomización y al de la solución de IN utilizada como control ($P < 0.05$) (**Tablas 3 y 4, Art. 4**).

Las diferencias en la respuesta hipoglucémica entre ambas formulaciones podrían explicarse por sus distintos tamaños de partícula. Para ello, es importante recordar que en el depósito de las partículas en el tracto respiratorio juega un papel fundamental el diámetro aerodinámico, el cual combina la densidad y el tamaño físico de la partícula. Si se considera que el diámetro aerodinámico óptimo se sitúa entre 1 μ m y 5 μ m y se asume que las microsferas conteniendo IN tienen una densidad similar a las blancas, es factible pensar que

parte de las partículas preparadas por emulsificación, con tamaños (diámetro de Feret = $5.98 \pm 3.35 \mu\text{m}$) y, consecuentemente, diámetros aerodinámicos teóricos ($8.85 \pm 4.99 \mu\text{m}$) muy superiores a los de las producidas por atomización (diámetro de Feret = $1.67 \pm 0.78 \mu\text{m}$; diámetro aerodinámico = $1.90 \pm 0.88 \mu\text{m}$), no son capaces de alcanzar la región alveolar; mientras que estas últimas sí se encuentran en el intervalo de tamaño adecuado para depositarse en dicha zona. Sin embargo, a pesar de este hecho, la respuesta hipoglucémica fue más prolongada para las partículas obtenidas por emulsificación. Los perfiles de liberación *in vitro* de IN a partir de ambos tipos de microsferas (ver **Figura 4, Art. 1** y **Figura 7, Art. 2**) no son diferentes, por lo que tampoco ofrecen una explicación razonable de los resultados observados *in vivo*. Nosotros planteamos la hipótesis de que las diferencias observadas *in vivo* entre ambas formulaciones podrían explicarse por diferencias en su captura por los macrófagos alveolares. Entre los factores que determinan la actividad fagocítica de los macrófagos se encuentran la carga superficial e hidrofilia, la concentración y composición de las partículas y el tamaño de las mismas (Zang y col., 1998; Akhtar y Lewis, 1997; Torché y col., 2000). Así, se sabe que la fagocitosis es máxima para partículas de $1\text{-}2 \mu\text{m}$, mientras que las partículas de $0.2 \mu\text{m}$ y $10 \mu\text{m}$ no son prácticamente fagocitadas (Tabata e Ikada, 1988; Makino y col., 2003). Por lo tanto, no se puede descartar que las partículas producidas por emulsificación (aproxim. $6 \mu\text{m}$) sean fagocitadas más lentamente que las obtenidas por atomización (aproxim. $1.6 \mu\text{m}$) por lo que, en consecuencia, permanecen más tiempo liberando IN en la región alveolar, donde tiene lugar la absorción del péptido.

A continuación, se evaluó el *efecto de la concentración de partículas y la concentración de CS*, sobre la respuesta hipoglucémica. Para ello, se prepararon por atomización, microsferas que contenían un 7.5% (p/p) de IN y que presentaban tamaños similares a las cargadas con un 15% (p/p) de péptido. En el primer caso, a cada rata se le administró una cantidad doble de polvo ($1500 \mu\text{g}$ de microsferas) para garantizar la misma dosis de IN (13.1 U/kg). De la comparación de los perfiles de glucemia y los parámetros farmacodinámicos de las dos formulaciones obtenidas por atomización (**Figura 4** y **Tabla 4, Art. 4**), se deduce que una mayor cantidad de polvo conteniendo 13.1 U/Kg de IN produce una

respuesta hipoglucémica significativamente más prolongada que una menor cantidad de polvo conteniendo la misma dosis ($P < 0.05$). A partir de estos resultados se pudo concluir que la prolongación del efecto hipoglucémico puede conseguirse también por un incremento de la cantidad de partículas a administrar.

Teniendo en cuenta la similitud en los niveles de glucemia obtenidos tras la administración de 1500 μg de las partículas obtenidas por atomización (7.5% de IN) y 750 μg de las obtenidas por emulsificación (15% de IN), las cuales tienen diferentes concentraciones (y cantidades) de CS, concluimos que al menos en este rango, la cantidad de CS no tuvo efecto sobre la respuesta hipoglucémica.

Determinación de la distribución in vivo en el tejido pulmonar de las microsferas de quitosano conteniendo FITC-BSA

Con el objetivo de tener una idea del depósito pulmonar de las microsferas de CS, que nos ayudase a comprender su comportamiento *in vivo*, se seleccionó la técnica de microscopía confocal. Los resultados de este estudio se recogen también en el **Artículo 4**. Para realizar esta investigación se hizo necesario identificar, en primer lugar, las condiciones óptimas de tinción del tejido pulmonar para obtener imágenes adecuadas del mismo. La puesta a punto del método se recoge en la **Parte II.2** de esta memoria. Como resultado se obtuvo que las imágenes obtenidas de los cortes de tejido de 2 mm de grosor tienen una calidad adecuada (**Figura 5**). Además se demostró que la sulforodamina B utilizada y la tinción por vía vascular ofrecen una adecuada definición del epitelio pulmonar (**Figura 4, 5 y 6**).

Antes de proceder a la administración de las microsferas y con fines comparativos, se evaluó la distribución de FITC-BSA en el tejido pulmonar tras instilación intratraqueal de una disolución de FITC-BSA (150 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$). Las imágenes obtenidas por microscopía confocal, 1h y 2h después de la administración de dicha disolución indican que la FITC-BSA se acumula en el intersticio y que una gran cantidad de la proteína es capturada por los macrófagos (**Figuras 5a, 5b y 5c, Art. 4**). La presencia de FITC-BSA en el

intersticio al cabo de las 2h puede ser explicada por el gran tamaño molecular de esta proteína (7 nm), que hace difícil su paso a través de los poros (diámetro = 0.5 nm - 3.4 nm) existentes en el epitelio alveolar de la rata (Berg y col., 1989).

Para investigar la distribución *in vivo* de las microsferas en la región alveolar, las formulaciones seleccionadas (microsferas de CS obtenidas por los procedimientos de doble emulsificación/evaporación del disolvente y atomización, (conteniendo un 15% de FITC-BSA) fueron administradas en forma de polvo seco por vía intratraqueal a ratas, siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado para las microsferas conteniendo IN.

Partiamos de la hipótesis de que las diferencias de tamaño entre las partículas obtenidas por emulsificación y por atomización son lo suficientemente grandes como para aportar información acerca de la influencia del tamaño de partícula sobre el depósito en los alvéolos y/o captura por los macrófagos alveolares ($3.92 \pm 1.92 \mu\text{m}$ y $1.95 \pm 0.82 \mu\text{m}$, para las partículas obtenidas por emulsificación y atomización, respectivamente). Aunque ambas formulaciones alcanzaron la región alveolar (**Figuras 5d-5i, Art. 4**), 1h después de la administración de las microsferas obtenidas por atomización, los macrófagos tenían una gran cantidad de partículas adheridas a su superficie o muy cerca de ella (**Figura 5d, Art. 4**) y 2h después de la administración, éstas partículas aparentemente habían sido internalizadas casi en su totalidad por los macrófagos alveolares (**Figuras 5e y 5f, Art. 4**). En contraste, al cabo de las 2h, las microsferas obtenidas por emulsificación no habían sido internalizadas, apareciendo adheridas a la superficie de los macrófagos (**Figuras 5h y 5i, Art. 4**). En consecuencia, desde un punto de vista cualitativo, los macrófagos alveolares parecen internalizar más rápidamente las partículas obtenidas por atomización que las producidas por emulsificación. Este hecho podría ser el resultado de las diferencias antes comentadas en el tamaño de partícula de ambas formulaciones y podría apoyar nuestra hipótesis acerca de la influencia del tamaño de partícula sobre la prolongación del efecto hipoglucémico, discutida previamente (*Evaluación del efecto hipoglucémico tras la administración de microsferas de quitosano conteniendo IN*).

Referencias bibliográficas

Akhtar, S., Lewis, K.J., 1997. Antisense oligonucleotide delivery to cultured macrophages is improved by incorporation into sustained-release biodegradable polymer microspheres. *Int. J. Pharm. Sci.*, 151, 57-67.

Anal, A.K., Stevens, W.F., Remuñán-López, C., 2006. Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *Int. J. Pharm.* (in press).

Arshady, R., 1991. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polyactides and related polyesters. *J. Control. Rel.*, 17, 1-22.

Berg, M.M., Kim, K.J., Lubman, R.L., Crandall, E.D., 1989. Hydrophilic solute transport across rat alveolar epithelium. *J. Appl. Physiol.*, 66, 2320-2327.

Bodmeier, R., Cheng, H., Tyle, P., Jarosz, P., 1991. Pseudoephedrine HCL microspheres formulated into an oral suspension dosage forms. *J. Control. Release*, 15, 65-77.

Bodmeier, R., Wang, H., Herrman, J., 1994. Microencapsulation of chlorpheniramine maleate, a drug with intermediate solubility properties, by a non-aqueous solvent evaporation technique. *STP Pharma Sci.*, 4, 275-281.

Chen, W., Lu, D.R., 1999. Carboplatin-loaded PLGA microspheres for intracerebral injection: formulation and characterization. *J. Microencapsul.*, 16, 551-63.

Chen, J.L., Chiang, C.H., Yeh, M.K., 2002. The mechanism of PLA microparticle formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method. *J. Microencapsul.*, 19, 333-46.

Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.*, 14, 1431-1436.

Crotts, G., Sah, H., Park, T.G., 1997. Adsorption determines in vitro release rate from biodegradable microparticles: quantitative analysis of surface area during degradation. *J. Control. Release*, 47, 101-111.

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

Gabor, F., Ertl, B., Wirth, M., Mallinger, R., 1999. Ketoprofen-poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: influence of manufacturing parameters and the type of polymer on the release characteristics. *J. Microencapsul.*, 16, 1-12.

Ginani, T.M.F., Navarro, M.V., Do Nascimento, E.G., De Oliveira, U.O.B., 1999. The study of influence of crosslinking and organic additives on the behaviour of chitosan gels. *Química Nova*, 22, 801-804.

Khalid, M.N., Agnely, F., Yagoubi, N., Grossiord, J.L., Couarraze, G., 2002. Water state characterization, swelling behaviour, thermal and mechanical properties of chitosan based networks. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15, 425-432.

Makino, K., Yamamoto, N., Higuchi, K., Harada, N., Ohshima, H., Terada, H., 2003. Phagocytic uptake of polystyrene microspheres by alveolar macrophages: effects of the size and surface properties of the microspheres. *Colloids Surf. B.*, 27, 33-39.

Mateovic, T., Kriznar, B., Bogata, J., Mrhar, A., 2002. The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres. *J. Microencapsul.*, 19, 29-36.

Nihant, N., Schugens, C., Grandles, C., Jerome, R., Teyssie, P., 1994. Polylactide microparticles prepared by double emulsion/evaporation technique. I. Effect of primary emulsion stability. *Pharm. Res.*, 11, 1479-84.

Orienti, I., Cerchiara, T., Luppi, B., Bigucci, F., Zuccari, G., Zecchi, V., 2002. Influence of different chitosan salts on the release of sodium diclofenac in colon-specific delivery. *Int. J. Pharm.*, 238, 51-59.

Peppas, N.A., 1997. Hydrogels and drug delivery. *Colloid. Interface Sci.*, 2, 531-537.

Polson, A., 1950. Some aspects of diffusion in solution and a definition of a colloidal particle. *J. Phys. Colloid. Chem.*, 54, 649-652.

Portero, A., Remuñán-López, C., Criado, M. T., Alonso, M. J., 2002b. Reacetylated chitosan microspheres for controlled delivery of antimicrobial agents to the gastric mucosa. *J. Microencapsulation*, 19, 797-809.

Reithmeier, H., Herrman, J., Göpferich, A., 2001a. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *J. Control. Release*, 73, 339-350.

Reithmeier, H., Herrman, J., Göpferich, A., 2001b. Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin. *Int. J. Pharm.*, 218, 133-43.

Torché, A.M., Le Corre, P., Albina, E., Jestin, A., Le Verge, R., 2000. PLGA microspheres phagocytosis by pig alveolar macrophages: Influence of poly(vinyl alcohol), concentration, nature of loaded-protein and copolymer nature. *J. Drug Target*, 7, 343-354.

Tabata, Y., Ikada, Y., 1988. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials*, 9, 356-362.

Vanbever, R., Ben-Jebria, A., Mintzes, J.D., Langer, R., Edwards, D.A., 1999. Sustained release of insulin from insoluble inhaled particles. *Drug Dev. Research*, 48, 178-185.

Zhang, Q., Liao, G., Wei, D., Nagai, T., 1998. Increase in gentamicin uptake by cultured mouse peritoneal macrophages and rat hepatocytes by its binding to polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 164, 21-27.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el trabajo experimental que se describen en esta memoria ponen de manifiesto el potencial de las microsferas desarrolladas, particularmente las de quitosano, como vehículos para la administración pulmonar de péptidos con fines sistémicos. De modo más detallado, se han extraído las siguientes conclusiones:

En relación a la **elaboración y caracterización *in vitro* de las microsferas** se ha podido concluir que:

1. Se han preparado mediante una técnica de atomización microsferas de quitosano con características morfológicas y aerodinámicas adecuadas (diámetros aerodinámicos inferiores a 5 μm) para administración pulmonar. La eficacia de asociación de las macromoléculas modelo insulina y FITC-BSA a las microsferas, se encuentra influenciada por el método de incorporación utilizado, el tipo de sal de quitosano y el tipo de macromolécula incorporada, alcanzándose eficacias de hasta 100%. La velocidad de liberación de las macromoléculas depende del tipo de macromolécula y de la carga teórica.
2. Se ha desarrollado un procedimiento de doble emulsificación/evaporación del disolvente que permite la obtención de microsferas de quitosano adecuadas para administración pulmonar. El tamaño y la morfología de las microsferas dependen de variables tales como el tipo de fase orgánica interna, el tipo de fase acuosa y la velocidad de agitación. La eficacia de asociación de las macromoléculas modelos insulina y FITC-BSA es muy elevada, alcanzándose valores de 80% y 100%, respectivamente. La

liberación de la FITC-BSA es lenta, cediéndose menos del 40% a las 12 horas, mientras que el 60% de insulina es liberado a los 60 minutos.

3. Se han puesto a punto procedimientos de simple y doble emulsificación/evaporación del disolvente que permiten producir microsferas de Dynasan® con tamaños aerodinámicos inferiores a 5 μm , adecuados para administración pulmonar. La eficacia de encapsulación de la proteína FITC-BSA en las microsferas lipídicas obtenidas por el método de doble emulsificación/evaporación del disolvente es de un 60%, siendo la velocidad de liberación lenta, con un 30% liberado al cabo de las 8 horas.

En relación a la **evaluación *in vivo* de las microsferas de quitosano** hemos podido concluir que:

4. La respuesta hipoglucémica de las microsferas de quitosano conteniendo insulina, tras su administración intratraqueal a ratas en forma de polvo seco, es satisfactoria. Las microsferas obtenidas por doble emulsificación/evaporación del disolvente, con mayor tamaño de partícula que aquellas obtenidas por atomización, dan lugar a una reducción más prolongada de los niveles de glucosa, lo cual podría estar relacionado con una captura más lenta por los macrófagos alveolares.
5. La técnica de microscopía confocal permitió confirmar que las microsferas de quitosano cargadas con FITC-BSA alcanzan y se depositan en la región alveolar. No obstante, se evidencia de forma cualitativa que las partículas más grandes, obtenidas por doble emulsificación/evaporación del disolvente, son captadas más lentamente por los macrófagos alveolares que las producidas por atomización, lo cual corrobora la conclusión anterior.

Bibliografia

BIBLIOGRAFÍA

Adams, W.P., Poochikian G., Taylor, A.S., Patel, R.M., Burke, G.P., Williams, R.L., **1994**. Regulatory aspects of modifications to innovator bronchodilator metered dose inhaler and development of generic substitutes. *J. Aerosol. Med.*, 7, 119-134.

Adjei, A.L, Garren, J., **1990**. Pulmonary delivery of peptide drugs: effect of particles size on bioavailability of leuprolide acetate in healthy male volunteers. *Pharm Res.*, 7, 565-569.

Adjei, A., Sundberg, D., Muller, J., Chun, A., **1992**. Bioavailability of leuprolide acetate following nasal and inhalation delivery to rats and healthy humans. *Pharm. Res.*, 9, 244-249.

Aguiar, M.M.G., Rodrigues, J.M., Silva, C.A., **2004**. Encapsulation of insulin-cyclodextrin complex in PLGA microspheres: a new approach for prolonged pulmonary insulin delivery. *J. Microencapsul.*, 21, 553-564.

Ahsan, F., Rivas, I.P., Khan, M.A., Torres-Suarez, A.I., **2002**. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers - liposomes and microspheres - on the phagocytosis by macrophages. *J. Control. Release*, 79, 29-40.

Aiba, S.I., **1993**. Studies on chitosan: 6. relationship between N-acetyl group distribution pattern and chitinase digestibility of partially N-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 15, 241-245.

Akbuğa, J., Bergisadi, N., **1999**. Effect of formulation variables on cis-platin loaded microspheres properties. *J. Microencapsul.*, 16, 697-703.

Akhtar, S., Lewis, K.J., **1997**. Antisense oligonucleotide delivery to cultured macrophages is improved by incorporation into sustained-release biodegradable polymer microspheres. *Int. J. Pharm. Sci.*, 151, 57-67.

Alcock, R., Blair, J.A., O'Mahony, D.J., Raouf, A., Quirk, A.V., **2002**. Modifying the release of leuprolide from spray dried OED microparticles. *J. Control. Release*, 82, 429-440.

Allen, T.M., Austin, G.A., Chonn, A., Lin, L., Lee, K.C., **1991**. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim. Biophys. Acta*, 1061, 56-65.

Altiere, R.J., Thompson, D.C., **1996**. Physiology and Pharmacology of the airways. En: Hickey, A.J., (Ed.), *Inhalation aerosols: physical and biological basis for therapy*. Marcel Dekker, New York, pp. 85-138.

Anal, A.K., Stevens, W.F., Remuñán-López, C., **2006**. Iontropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *Int. J. Pharm.* (in press).

Araie, M., Maurice, D., **1987**. The rate of diffusion of fluorophores through the corneal epithelium and stroma. *Exp. Eye. Res.*, 44, 73-87.

Armstrong, D.J., Elliott, N.C., Ford, J.L., Gadsdon, D., McCarthy, G.P., Rostron, C., Warsley, M.D., **1996**. Poly-(D,L-Lactic Acid) microspheres incorporating histological dyes for intra-pulmonary histopathological investigations. *J. Pharm. Pharmacol.*, 48, 258-262.

Arshady, R., **1991**. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polyactides and related polyesters. *J. Control. Release*, 17, 1-22.

Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S.S., Illum, L., **1994**. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.*, 11, 1358-1361.

Aspden, T.J., Mason, J.D.T., Jones, N.S., Lowe, J., Skaugrud, O., Illum, L., **1997**. Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J. Pharm. Sci.*, 86, 509-513.

Banga, A., **1995**. Therapeutic peptides and proteins: Formulation, processing and delivery. Techomic Publishing Company Inc, Lancaster, Pennsylvania.

Baron, P.A., Mazumder, M.K., Cheng, Y.S., **1993**. Direct-reading techniques using optical particle detection. En: Willeke, K., Baron, P.A., (Eds.), *Aerosol measurements: principles, techniques and applications*. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 381-409.

Barrat, G., Tenu, J.P., Yapó, A., Petit, J.F., **1986**. Preparation and characterization of liposome containing mannosylated phospholipids capable of targeting to macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, 862, 153-164.

Behrens, I., Vila, A., Alonso, M.J., Kissel, T., **2002**. Comparative uptake studies of bioadhesive and non bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle absorption and transport. *Pharm. Res.*, 19, 1185-1193.

Ben-Jebria, A., Chen, D., Eskew, M., Vanbever, R., Langer, R., Edwards, D.A., **1999**. Large porous particles for sustained protection from carbacol-induced bronchoconstriction in guinea pigs. *Pharm. Res.*, 16, 555-561.

Berg, M.M., Kim, K.J., Lubman, R.L., Crandall, E.D., **1989**. Hydrophilic solute transport across rat alveolar epithelium. *J. Appl. Physiol.*, 66, 2320-2327.

Bernkop-Schnürch, A., **2000**. Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems. *Int. J. Pharm.*, 194, 1-13.

Bodmeier, R., Chen, H., Paeratakul, O., **1989**. A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles. *Pharm. Res.*, 6, 413-417.

Bodmeier, R., Cheng, H., Tyle, P. y Jarosz, P., **1991**. Pseudoephedrine HCL microspheres formulated into an oral suspension dosage forms. *J. Control. Release*, 15, 65-77.

Bodmeier, R., Wang, H., Herrman, J., **1994**. Microencapsulation of chlorpheniramine maleate, a drug with intermediate solubility properties, by a non-aqueous solvent evaporation technique. *STP Pharma Sci.*, 4, 275-281.

Borchard, G., Lußen, H.L., De Boer, G.A., Verhoef, J.C., Lehr, C.M., Junginger, H.E., **1996**. The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption III: Effects of chitosan glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro. *J. Control. Release*, 39, 131-138.

Bosquillon, C., Lombry, C., Préat, V., Vanbever, R., **2001**. Influence of formulations excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance. *J. Control. Release*, 70, 329-339.

Bosquillon, C., Préat, V., Vanbever, R., **2004**. Pulmonary delivery of growth hormone using dry powders and visualization of its local fate in rats. *J. Control. Release*, 96, 233-244.

- Bot, A.I., Tarara, T.E., Smith, D.J., Bot, S.R., Woods, C.M., Weers, J.G., **2000**. Novel lipid-based hollow-porous microparticles as a platform for immunoglobulin delivery to the respiratory tract. *Pharm. Res.*, 17, 275-283.
- Broadhead, J., Edmond, R.S.K., Rhodes, C.T., **1992**. The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 18, 1169-1206.
- Brown, A., Slusser, J.P., **1994**. Propellant-driven aerosols of functional proteins as potential therapeutics agents in the respiratory tract. *Immunopharmacology*, 28, 241-257.
- Brown, A., Pickrell, J.A., **1995**. Propellant-driven aerosols for delivery of proteins in the respiratory tract. *J. Aerosol. Med.*, 8, 43-57.
- Burkitt, H.G., Young, B., Heath, J.W., **1997**. Aparato respiratorio. En: *Histología funcional*. Churchill Livingstone, Madrid, pp. 220-234.
- Byron, P.R., **2004**. Drug delivery devices: issues in drug development. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 1, 321-328.
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., **1997a**. Novel hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 63, 25-132.
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., **1997b**. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.*, 14, 1431-1436.
- Carrión-Recio, D., Vila-Jato, J.L., Remuñán-López, C., **2006**. Development of a double emulsion-solvent evaporation method to produce chitosan microspheres for lung protein delivery. Submitted to *International Journal of Pharmaceutics*.
- Cavalli, R., Caputo, O., Parlotti, M.E., Trotta, M., Scarnecchia, C., Gasco, M.R., **1997**. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 148, 47-54.
- Chandra, T., Miller, I.F., Yeates, D.B., **1992**. A pore transport model for pulmonary alveolar epithelium. *Ann. Biomed. Eng.*, 20, 481-494.
- Chen, J.L., Chiang, C.H., Yeh, M.K., **2002**. The mechanism of PLA microparticle formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method. *J. Microencapsul.*, 19, 333-346.
- Chen, W., Lu, D.R., 1999. Carboplatin-loaded PLGA microspheres for intracerebral injection: formulation and characterization. *J. Microencapsul.*, 16, 551-563.
- Cipolla, D., Farr, S.J., Gonda, I., Otulana, B., **2001**. Delivery of biologics to the lung. En: Hansel T.T., Barnes P.J. (Eds.), *New drugs for asthma, allergy and COPD*. Prog. Respir. Res. Karger, London, 31, pp. 20-23.
- Clark, A.R., Egan, M., **1994**. Modelling the deposition of inhaled powdered drug aerosols. *J. Aerosol Sci.*, 25, 175-186.
- Clark, A., **2002**. Formulation of proteins and peptides for inhalation. *Drug Del. Syst. & Sci.*, 2, 73-77.
- Clark, A.R., **2004**. Pulmonary delivery technology: recent advances and potential for the new millennium. En: Hickey A.J. (Ed.), *Pharmaceutical inhalation aerosol technology*, Marcel Dekker, New York, pp. 571-592.
- Codrons, V., Vanderbist, F., Verbeeck, R.K., Arras, M., Lison, D., Preat V., Vanbever, R., **2003**. Systemic delivery of parathyroid hormone (1-34) using inhalation dry powders in rats. *J. Pharm. Sci.*, 92, 938-950.

- Codrons, V., Vanderbist, F., Ucakar, B., Preat, V., Vanbever, R., **2004**. Impact of Formulation and Methods of Pulmonary Delivery on Absorption of Parathyroid Hormone (1-34) from Rat Lungs. *J. Pharm. Sci.*, 93, 1241-1252.
- Colthorpe, P., Farr, S.F., Taylor, G., Smith, I.J., Wyatt, D., **1992**. The pharmacokinetics of pulmonary delivery insulin: a comparison of intratracheal and aerosol administration to the rabbit. *Pharm. Res.*, 9, 764-768.
- Concessio, N.M., Knowles, M.R., Hickey, A.J., **1999**. Pharmaceutical dry powder aerosols: Correlation of powder properties with dose delivery and implications for pharmacodynamic effect. *Pharm. Res.*, 16, 828-834.
- Conhaim, R.L., Eaton, A., Staub, N.C., Heath, T.D., **1988**. Equivalent pore estimate for the alveolar-airway barrier in isolated dog lung. *J. Appl. Physiol.*, 64, 1134-1142.
- Conhaim, R.L., **1989**. Airway level at which edema liquid enters the air space of isolated dog lungs. *J. Appl. Physiol.*, 67, 2234-2242.
- Conhaim, R.L., Watson, K.W., Lai-Fook, S.J., Harms, B.A., **2001**. Transport properties of alveolar epithelium measured by molecular heterostarh absorption in isolated rat lungs. *J. Appl. Physiol.*, 91, 1730-1740.
- Cook, R.O., Pannu, R.K., Kellaway, I.W., **2005**. Novel sustained release microspheres for pulmonary drug delivery. *J. Control. Rel.*, 104, 79-90.
- Courrier, H.M., Butz, N., Vandamme, T.F., **2002**. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, 19, 425-498.
- Crooks, P.A., **1992**. Drug targeting to the lung: chemical and biochemical considerations. En: Hickey A.J., (Ed.), *Pharmaceutical inhalation aerosol technology*. Marcel Dekker, New York, pp. 83-127.
- Crotts, G., Sah, H., Park, T.G., **1997**. Adsorption determines in vitro release rate from biodegradable microparticles: quantitative analysis of surface area during degradation. *J. Control. Release*, 47, 101-111.
- Cryan, S.A., **2005**. Carrier-based strategies for targeting protein and peptide drugs to the lungs. *AAPS Journal*, 7, E20-E41 (<http://www.aapsj.org>).
- Darquenne, C., Brand, P., Heyder, J., Paiva, M., **1997**. Aerosol dispersion in human lung: comparison between numerical simulations and experiments for bolus tests. *J. Appl. Physiol.*, 83, 966-974.
- De Campos, A., Sánchez, A., Alonso, M.J., **2001**. Chitosan nanoparticles : a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int. J. Pharm.*, 224, 159-168.
- Deffebach, M.E., Bryan, C.J., Hoy, C.M., **1996**. Protein movement across cultured guinea pig trachea: specificity and effect of transcytosis inhibitors. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 271, L744-L752.
- Dellamary, L.A., Tarara, T.E., Smith, D.J., Woelk, C.H., Adractas, A., Costello, M.L., Gill, H., Weers, J.G., **2000**. Hollow porous particles in metered dose inhalers. *Pharm. Res.*, 17, 168-174.
- Dornish, M., Hagen, A., Hansson, E., Peucheur, C., Vedier, F., Skaugrud, O., **1997**. Safety of Protasan™: Ultrapure chitosan salts for biomedical and pharmaceutical use. En: Domard, A., Roberts, G.A.F., Varum, K.M. (Eds.), *Advances in chitin science*. Jacques Andre publisher, Lyon, pp. 664-670.

- Edwards, D.A., Hanes, J., Caponetti, G., Hikach, J., Ben-Jebria, A., Eskew, M.L., Mintzes, J., Deaver, D., Lotan, N., Langer, R., **1997**. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science*, 276, 1868-1871.
- Edwards, D.A., Ben-Jebria, A., Langer, R., **1998**. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J. Applied. Physiol.*, 85, 379-385.
- Effross, R.M., Mason, G.R., **1983**. Measurements of pulmonary epithelial permeability in vivo. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 127, S59-S66.
- El-Baseir, M.M., Phipps, M.A., Kellaway, I.W., **1997**. Preparation and subsequent degradation of poly(l-lactic acid) microspheres suitable for aerolisation: a physico-chemical study. *Int. J. Pharm.*, 151, 145-153.
- El-Basseir, M.M., Kellaway, I.W., **1998**. Poly (l-lactic acid) microspheres for pulmonary drug delivery: release kinetics and aerosolization studies. *Int. J. Pharm.*, 175, 135-145.
- El-Gibaly, I., **2002**. Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.*, 249, 7-21.
- Erni, C., Suard, C., Freitas, S., Dreher, D., Merkle, H.P., Elke, W., **2002**. Evaluation of cationic solid lipid microparticles as synthetic carriers for the targeted delivery of macromolecules to phagocytic antigen-presenting cells. *Biomaterials*, 23, 4667-4676.
- European pharmacopoeia. 1980. Preparation for inhalation: aerodynamic assessment of fine particles. Moulin-lès-Metz. Maisonneuve. France.
- Evora, C., Soriano, I., Rogers, R.A., Shakesheff, K.M., Hanes, J., Langer, R., **1998**. Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: The effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. *J. Control. Release*, 51, 143-152.
- Fandy, T.E., Lee, V.H.L., Ann, D.K., Crandall, E.D., Kim, K.J., **2001**. Mechanisms of immunoglobulin G (IgG) transport across primary cultured rat alveolar epithelial cell monolayers. *Proc. 28th Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mat. and 4th Consumer & Diversified Products Conference.*, 23-27.
- Fawcett, W., **1996**. Sistema respiratorio. En: *Tratado de histología*, Editado por Interamericana, División de McGRAW-HILL, Madrid, pp. 765-790.
- Fernández-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., **1999**. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.*, 16, 1576-1581.
- Folkesson, H.G., Weström, B.R., Karlsson, B.W., **1990**. Permeability of the respiratory tract to different-sized macromolecules after intratraqueal instillation in young and adult rats. *Acta Physiol. Scand.*, 139, 347-354.
- Folkesson, H.G., Weström, B.R., Dahlbäck, M., Lundin, S., Karlsson, B.W., **1992**. Passage of aerosolized BSA and the nona-peptide dDAVP via the respiratory tract in young and adult rats. *Exp. Lung Res.*, 18, 595-614.
- Folkesson, H.G., Weström, B.R., Pierzynowsky, S.G., Svendsen, J., Karlsson, B.W., **1993**. Respiratory tract passage of different sized-macromolecules in developing pigs. *Acta Physiol. Scand.*, 147, 173-178.
- Folkesson, H.G., Weström, B.R., Karlsson, B.W., **1998**. Effect of systemic and local immunization on alveolar epithelial permeability to protein in the rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157, 324-327.
- French, D.L., Edwards, D.A., Niven, R.W., **1996**. The influence of formulation on emission, deaggregation and deposition of dry powders for inhalation. *J. Aerosol Sci.*, 27, 769-783.

Gabor, F., Ertl, B., Wirth, M., Mallinger, R., **1999**. Ketoprofen-poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: influence of manufacturing parameters and the type of polymer on the release characteristics. *J. Microencapsul.*, 16, 1-12.

García-Contreras, L., Morcol, T., Bell, S.J., Hickey, A.J., **2003**. Evaluation of novel particles as pulmonary delivery systems for insulin in rats. *AAPS Pharm. Sci.*, 1-11 (<http://www.aapsj.org>).

Gartner, L.P., Hiatt, J.L., **1997**. Sistema respiratorio. En: *Histología*. Editado por Interamericana, División de McGRAW-HILL, Madrid, pp. 301-319.

Gehr, P., Green, F.H.Y., Geiser, M., Hof, V.I., Lee, M.M., Schurch, S., **1996**. Airway surfactant, a primary defense barrier: mechanical and immunological aspects. *J. Aerosol Med.*, 9, 163-181.

Geneser, F., **2000**. Aparato respiratorio. En: *Histología*. Editado por Editorial Médica Panamericana, Madrid, pp. 535-553.

Genta, I., Pavanetto, F., Conti, B., Giunchedi, P., Conte, U., **1995**. Improvement of dexamethasone dissolution rate from spray-dried chitosan microspheres. *STP Pharma Sci.*, 5, 202-207.

Gerrity, T.R., Lee, P.S., Hass, F.J., Marinelli, A., Werner, P., Lourenco, R.V., **1979**. Calculated deposition of inhaled particles in the airway generations of normal subjects. *J. Appl. Physiol.*, 47, 867-873.

Ginani, T.M.F., Navarro, M.V., Do Nascimento, E.G., De Oliveira, U.O.B., **1999**. The study of influence of crosslinking and organic additives on the behaviour of chitosan gels. *Química Nova*, 22, 801-804.

Giner, J., Basualdo, L.V., Casan, P., Hernández, C., Macián, V., **2000**. Normativa sobre la utilización de fármacos inhalados. *Arch. Bronconeumol.*, 36, 34-43.

Grenha, A., Seijo B., Remuñán-López, C., **2005**. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 25, 427-437.

Hamdi, G., Ponchel, G., Besnard, M., Duchêne, D., **1999**. Loading and in vitro release of salbutamol from degradable cross-linked starch microspheres intended for pulmonary administration. *S.T.P. Pharma Sci.*, 9, 573-577.

Hanes, J., Evora C.E., Ben-Jebria, A., Edwards, D.A., Langer, R., **1997**. Porous dry-powder PLGA microspheres coated with lung surfactant for systemic insulin delivery via the lung. *Proc. Int't Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 57-58.

Hanes, J., Dawson, M., Har-el, Y., Suh, J., Fiegel, J., **2004**. Gene delivery to the lung. En: Hickey A.J. (Ed.), *Pharmaceutical inhalation aerosol technology*. Marcel Dekker, New York, pp. 489-539.

Hastings, R.H., Grady, M., Sakuma, T., Mattay, M.A., **1992**. Clearance of different-sized proteins from the alveolar space in humans and rabbits. *J. Appl. Physiol.*, 73, 1310-1316.

Hastings, R.H., Wright, J.R., Albertine, K.H., Ciriales, R., Mattay, M.A., **1994**. Effect of endocytosis inhibitors on alveolar clearance of albumin, immunoglobulin G, and SP-A in rabbits. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 266, L544-L552.

Hastings, R.H., Folkesson, H.G., Petersen, V., Ciriales, R., Matthay, M.A., **1995a**. Cellular uptake of albumin from lungs of anesthetized rabbits. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 269, 453-462.

Hastings, R.H., Grady, M., Sakuma, T., Matthay, M.A., **1995b**. Clearance of different-sized proteins in human cultured alveolar A 549 cell monolayer. *Pharm. Res.*, 12, 1115-1119.

- Hastings, R.H., Folkesson, H.G., Matthay, M.A., **2004**. Mechanisms for alveolar protein clearance in the intact lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 286, L679-689.
- He, P., Davis, S.S., Illum, L., **1999**. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int. J. Pharm.*, 187, 53-65.
- Heyder, J., Armbruster, L., Gebhart, J., Grein, E., Stahlhofen, W., **1975**. Total deposition of aerosol particles in the human respiratory tract for nose and mouth breathing. *J. Aerosol Sci.*, 6, 311-328.
- Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I., **1988**. Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administrations. *Polym. Mat. Sci. Eng.*, 59, 897-901.
- Hirano, S., Tsuchida, H., Nagao, N., **1989**. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials*, 10, 574-576.
- Hu, F.Q., Yuan, H., Zhang, H.H., Fang, M., **2002**. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int. J. Pharm.*, 239, 121-128.
- Huang, Y.C., Yeh, M., Chiang, C.H., **2002**. Formulation factors in preparing BTM-chitosan microspheres by spray-drying method. *Int. J. Pharm.*, 242, 239-242.
- John, T.A., Vogel, S.M., Minshall, R.D., Ridge, K., Tiruppathi M.A.B., **2001**. Evidence for the role of alveolar epithelial gp60 in active transalveolar albumin transport in the rat lung. *J. Physiol.*, 533, 547-559.
- Jones, B.G., Dickinson, P.A., Gumbleton, M., Kellaway, I.W., **2002a**. Lung surfactant phospholipids inhibit the uptake of respirable microspheres by the alveolar macrophage NR8383. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54, 1065-1072.
- Jones, B.G., Dickinson, P.A., Gumbleton, M., Kellaway, I.W., **2002b**. The inhibition of phagocytosis of respirable microspheres by alveolar and peritoneal macrophages. *Int. J. Pharm.*, 236, 65-79.
- Kas, H.S., **1997**. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. *J. Microencapsul.*, 14, 659-711.
- Kawashima, Y., Handa, T., Kasai, A., Takenaka, H., Lin, S.Y., Ando, Y., **1985**. Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium tripolyphosphate-chitosan. *J. Pharm. Sci.*, 74, 264-268.
- Khalid, M.N., Agnely, F., Yagoubi, N., Grossiord, J.L., Couarraze, G., **2002**. Water state characterization, swelling behaviour, thermal and mechanical properties of chitosan based networks. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15, 425-432.
- Kim, K.J., Malik, A.B., **2003a**. Protein transport across the lung epithelial barrier. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 284, L247-L259.
- Kim, K.J., Matsukawa, Y., Yamahara, H., Kalra, V.K., Lee, V.H.L., Crandall, E.D., **2003b**. Absorption of intact albumin across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 284, L458-L465.
- Knapczyk, J., Krówczyński, L., Krzck, J., Brzeki, M., Nirnberg, E., Schenk, D., Struscyk, H., **1989**. Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical applications. En: Skak-Braek, B., Anthonsen, T., Sandford, P., (Eds.), *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. Elsevier, London, pp. 657-663.
- Kobayhashi, S., Kondo, S., Juni, K., **1995**. Permeability of peptides and proteins in human cultured alveolar A549 cell monolayer. *Pharm. Res.*, 12, 1115-1119.

- Kotze, A.F., de Leeuw, B.J., Lueßen, H.L., de Boer, A.G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., **1997**. Chitosan for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.*, 159, 243-253.
- Kumbar, S.G., Kulkarni, A.R., Aminabhavi, T.M., **2002**. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of cross-linking agent. *J. Microencapsul.*, 19, 173-180.
- Kunisawa, J., Okudaira, A., Tsutusmi, Y., Takahashi, I., Nakanishi, T., Kiyono, H., Mayumi, T., **2000**. Characterization of mucoadhesive microspheres for the induction of mucosal and systemic immune responses. *Vaccine*, 19, 589-594.
- Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Schacht, E.H., Junginger, H.E., **1992**. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some natural polymers. *Int. J. Pharm.*, 78, 43-48.
- Lim, S.T., Forbes, B., Martin, G.P., Brown, M.B., **2001**. In vivo and in vitro characterization of novel microparticulates based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2 (4), 1-11 (<http://www.pharmscitech.com>).
- Li, W-I., Perzl, M., Heyder, J., Langer, R., Brain, J.D., Englmeier, K-H., Niven, R.W., Edwards, D.A., **1996**. Aerodynamics and aerosol particle deaggregation phenomena in model oral-pharyngeal cavities. *J. Aerosol Sci.*, 27, 1269-1286.
- Lipka, E., Crison, J., Amidon, G.L., **1996**. Transmembrane transport of peptide type compounds: prospects for oral delivery. *J. Control. Release*, 39, 121-129.
- Lippacher, A., Muller, R.H., Mader, K., **2001**. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 214, 9-12.
- Liu, F.Y., Shao, Z., Kildsig, D.O., Mitra, A.K., **1993**. Pulmonary delivery of free and liposomal insulin. *Pharm. Res.*, 10, 228-232.
- Lombry, C., Bosquillon, C., Préat, V., Vanbever, R., **2002**. Confocal imaging of rat lungs following intratracheal delivery of dry powders or solutions of fluorescent probes. *J. Control. Release*, 83, 331-341.
- Lombry, C., Edwards, D.A., Préat, V., Vanbever, R., **2004**. Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 286, L1002-L1008.
- Maa, Y., Hsu, C., **1996**. Liquid-liquid emulsification by static mixer for use in microencapsulation. *J. Microencapsul.*, 13, 419-33.
- Maa, Y.F., Nguyen, P.A., Sweeney, T., Shire, S.J., Hsu, C.C., **1999**. Protein inhalation powders: Spray drying vs Spray freeze drying. *Pharm. Res.*, 16, 249-254.
- Machida, Y.P., Sannon, T., Nagri, T., **1991**. Preparation of microspheres containing fluorouracil using the «dry-in-oil» method and its release characteristics. *STP Pharma Sci.*, 1, 363-368.
- Makino, K., Yamamoto, N., Higuchi, K., Harada, N., Ohshima, H., Terada, H., **2003**. Phagocytic uptake of polystyrene microspheres by alveolar macrophages: effects of the size and surface properties of the microspheres. *Colloids Surf. B.*, 27, 33-39.
- Mateovic, T., Kriznar, B., Bogata, J., Mrhar, A., **2002**. The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres. *J. Microencapsul.*, 19, 29-36.
- Matsukawa, Y., Yamahara, H., Lee, V.H., Crandall, E.D., Kim, K.J., **1996**. Horseradish peroxidase transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm. Res.*, 13, 1331-1335.

- Matsukawa, Y., Lee, V.H., Crandall, E.D., Kim, K.J., **1997**. Size-dependent dextran transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J. Pharm. Sci.*, 86, 305-309.
- Matsukawa, Y., Yamahara, H., Yamashita, F., Lee, V.H., Crandall, E.D., Kim, K.J., **2000**. Rates of protein transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J. Drug. Target.*, 7, 335-342.
- Mitchell, J.P., Nagel, M.W., **1999**. Time-of-flight aerodynamic particle size analysers: their use and limitations for the evaluation of medical aerosols. *J. Aerosol Med.*, 12, 217-40.
- Mitra, R., Pezron, I., Li, Y., Mitra, A.K., **2001**. Enhanced pulmonary delivery of insulin by lung lavage fluid and phospholipids. *Int. J. Pharm.*, 217, 25-31.
- Morel, S., Ugazio, E., Cavalli, R., Gasco, M.R., **1996**. Thymopentin in solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 132, 259-261.
- Morimoto, K., Katsumata, H., Yabuta, T., Iwanaga, K., Kakemi, M., Tabata, Y., Ikada, Y., **2000**. Gelatin microspheres as a pulmonary delivery system: evaluation of salmon calcitonin absorption. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52, 611-617.
- Morita, T., Yamamoto, A., Itashida, M., Sezaki, H., **1993**. Effect of various absorption promoters on pulmonary absorption of drugs with different molecular weight. *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 259-262.
- Müller, R.H., Rühl, D., Runge, S., Schulze-Forster, K., Mehnert, W., **1997**. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharm. Res.*, 14, 458-462.
- Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S., **2000**. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 161-177.
- Muzzarelli, R.A.A., **1985**. Chitin. En: Aspinall, G.O., (Ed.), *The polysaccharides (Vol.3)*. Academic Press, Orlando, pp. 417-450.
- Muzzarelli, R.A.A., **1997**. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell. Mol. Life Sci.*, 53, 131-140.
- Nihant, N., Schugens, C., Grandles, C., Jerome, R., Teyssie, P., **1994**. Polylactide microparticles prepared by double emulsion/evaporation technique. I. Effect of primary emulsion stability. *Pharm. Res.*, 11, 1479-84.
- Niven, R., **1993**. Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosols. *Pharm. Technol.*, 17, 72-81.
- Niven, R.W., Lott, F.D., Cribbs, J.M., **1993**. Pulmonary absorption of recombinant methionyl human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) after intratracheal instillation to the hamster. *Pharm. Res.*, 10, 1604-1610.
- Niven, R.W., Lott, F.D., Ip, A.Y., Cribbs, J.M., **1994**. Pulmonary delivery of powders and solutions containing recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) to the rabbit. *Pharm. Res.*, 11, 1101-1109.
- Ohtani, T., Murakami, M., Yamamoto, A., Takada, k., Muranishi, S., **1991**. Effect of absorption enhancers on pulmonary absorption of fluorescein isothiocyanate dextrans with various molecular weights. *Int. J. Pharm.*, 77, 141-150.
- Okamoto, H., Aoki, M., Danjo, K., **2000**. A novel apparatus for rat in vivo evaluation of dry powder formulations for pulmonary administration. *J. Pharm. Sci.*, 89, 1028-1035.
- Okumura, K., Iwakawa, S., Yoshida, T., Komada, F., **1992**. Intratracheal delivery of insulin. Absorption from solution and aerosol by rat lung. *Int. J. Pharm.*, 88, 63-73.

Orienti, I., Cerchiara, T., Luppi, B., Bigucci, F., Zuccari, G., Zecchi, V., **2002**. Influence of different chitosan salts on the release of sodium diclofenac in colon-specific delivery. *Int. J. Pharm.*, 238, 51-59.

Patton, J.S., Platz, R.M., **1992**. Routes of delivery: Case studies. (2) Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 8, 179-196.

Patton, J.S., Trinchero, P., Platz, R.M., **1994**. Bioavailability of pulmonary delivery peptides and proteins: α -interferon, calcitonins and parathyroid hormones. *J. Control. Release*, 28, 79-85.

Patton, J.S., **1996**. Mechanism of macromolecule absorption by the lungs. *Adv. Drug Del. Rev.*, 19, 3-36.

Pavanetto, F., Perugini, P., Canti, B., Modena, T., Genta, I., **1996**. Evaluation of process parameters involved in chitosan microspheres preparation by the O/W/O multiple emulsion method. *J. Microencapsul.*, 13, 679-688.

Peppas, N.A., **1997**. Hydrogels and drug delivery. *Colloid. Interface Sci.*, 2, 531-537.

Pfützner, A., Mann, A.E., Steiner, S., **2002**. Technosphere™/insulin- A new approach for effective delivery of human insulin via the pulmonary route. *Diabetes Tech. Ther.*, 4, 589-594.

Pohl, R., Kramer, P.A., Thrall, R.S., **1998**. Confocal laser scanning microscopy of intact unfixed rat lungs. *Int. J. Pharm.*, 168, 69-77.

Polson, A., **1950**. Some aspects of diffusion in solution and a definition of a colloidal particle. *J. Phys. Colloid. Chem.*, 54, 649-652.

Portero, A., Remuñán-López, C., Nielsen, H.M., **2002a**. The potential of chitosan in enhancing peptide absorption across the TR146 cell culture model - an in vitro model of the buccal mucosa. *Pharm. Res.*, 19, 169-174.

Portero, A., Remuñán-López, C., Criado, M.T., Alonso, M.J., **2002b**. Reacetylated chitosan microspheres for controlled delivery of anti-microbial agents to the gastric mucosa. *J. Microencapsul.*, 19, 797-809.

Putney, S.D., Burke, P.A., **1998**. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nat. Biotechnol.*, 16, 153-157.

Real Farmacopea Española. **2005**. Preparaciones para inhalación: evaluación aerodinámica de partículas finas. Madrid. España.

Reithmeier, H., Hermann, J., Gopferich, A., **2001a**. Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin. *Int. J. Pharm.*, 218, 133-143.

Reithmeier, H., Hermann, J., Gopferich, A., **2001b**. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *J. Control. Release*, 73, 339-350.

Remuñán-López, C., Portero, A., Lemos, M., Vila-Jato, J.L., Núñez, M.J., Riveiro, P., Alonso, M.J., **2000**. Chitosan microspheres for specific delivery of amoxicillin to the gastric cavity. *STP Pharm. Sci.*, 10, 69-76.

Remuñán-López, C., Lorenzo-Lamosa, M.L., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., **1998**. Development of new chitosan-cellulose multicore microparticles for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45, 49-56.

Rios, A., Gordillo, M.E., Bocanegra, C., Maldonado, J.A., **1994**. Administración nasal e inhalatoria. En: Ramos, B.S., Aznar, M.D. (Eds.), Administración de medicamentos: Teoría y práctica. Diaz de Santos, Madrid, pp. 131-149.

- Sandrap, P., Moës, A.J., **1993**. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Int. J. Pharm.*, 98, 157-64.
- Sanna, V., Kirschvink, N., Gustin, P., Gavini, E., Roland, I., Delattre, L., Evrard, B., **2004**. Preparation and in vivo toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 5(2), 1-7 (<http://www.aspspharmstech.org>).
- Schipper, N.G.M., Vårum, K.M., Artursson, P., **1996**. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm. Res.*, 13, 1686-1692.
- Schipper, N.G.M., Olsson, S., Hoogstraate, J.A., deBoer, A.G., Vårum, K.M., Artursson, P., **1997**. Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res.*, 14, 923-929.
- Schulz, H., **1998**. Mechanisms and factors affecting intrapulmonary particle deposition: Implications for efficient inhalation therapies. *Pharm. Sci. Tech. Today*, 1, 336-344.
- Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J.S., Muller, R.H., **1994**. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J. Control. Release*, 30, 83-96.
- Schwendeman, S.P., Cardamone, M., Klivanov, A., Langer, R., Brandon, M.R., **1996**. Stability of proteins and their delivery from degradable polymer microspheres. *Drugs Pharm. Sci.*, 77, 1-49.
- Sharma, R., Saxena, D., Dwivedi, A.K., Misra, A., **2001**. Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis. *Pharm. Res.*, 18, 1405-1410.
- Shen, Z., Zhang, Q., Wei, S., Nagai, T., **1999**. Proteolytic enzymes as a limitation for pulmonary absorption of insulin: in vitro and in vivo investigations. *Int. J. Pharm.*, 192, 115-121.
- Shenderova, A., Burke, T.G., Schwendeman, S.P., **1999**. The acidic microclimate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins. *Pharm. Res.*, 16, 241-248.
- Siflinger-Birnboim, A., Schnitzer, J.E., Lum, H., Blumenstock, F.A., Shen, C.P.J., Vecchio, P.J.D., Malik, A.B., **1991**. Lectin binding to gp60 decreases specific albumin binding and transport in pulmonary artery endothelial monolayers. *J. Cell. Physiol.*, 149, 575-584.
- Smaldone, G., LeSouef, P.N., **2002**. Nebulization: the device and clinical considerations. En: Bisgard, H., O'Callaghan, C., (Eds.), *Drug delivery to the lung*. Marcel Dekker, New York, pp. 269-302.
- Smith, P.L., **1997**. Peptide delivery via the pulmonary route: a valid approach for local and systemic delivery. *J. Control. Release*, 46, 99-106.
- Steckel, H., Brandes, H.G., **2004**. A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery. *Int. J. Pharm.*, 278, 187-195.
- Steiner, S., Pfützner, A., Harzer, O., Heinemann, L., Rave, K., **2002**. Technosphere™/insulin- Proof of concept study with a new insulin formulation for pulmonary delivery. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 110, 17-21.
- Steinman, R.M., Mellman, I.S., Muller, W.A., Cohn, Z.A., **1983**. Endocytosis and recycling of plasma membrane. *J. Cell. Biol.*, 96, 1-27.

- Suarez, S., O'Hara, P., Kazantseva, M., Newcomer, C.E., Hopfer, R., McMurray, D.N., Hickey, A.J., **2001a**. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: screening in an infectious disease model. *Pharm. Res.*, 18, 1315-1319.
- Suarez, S., O'Hara, P., Kazantseva, M., Newcomer, C.E., Hopfer, R., McMurray, D.N., Hickey, A.J., **2001b**. Airways delivery of rifampicin microparticles for the treatment of tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 48, 431-434.
- Sugahara, K., Freidenberg, G.R., Mason, R.J., **1984**. Insulin binding and effects on glucose and transepithelial transport by alveolar type II cells. *Am. J. Physiol.*, 247, C472-C477.
- Surendrakumar, K., Martyn, G.P., Hodggers, E.C.M., Jansen, M., Blair, J.A., **2003**. Sustained release of insulin from sodium hyaluronate based dry powder formulations after pulmonary delivery to beagle dogs. *J. Control. Release*, 91, 385-394.
- Tabata, Y., Ikada, Y., 1988. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials*, 9, 356-362.
- Takeuchi, H., Yamamoto, H., Kawashima, Y., **2001**. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47, 39-54.
- Taylor, G., Kellaway, I., **2001**. Pulmonary drug delivery. En: Hillery, A., Lloyd, A., Swarbrick. (Eds.), *Drug delivery and targeting*. Taylor and Francis, New York, pp. 269-300.
- Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C., Mørck-Nielsen, H., **2005**. Comparative Studies of Chitosan Nanoparticles and Molecules in Calu-3 and TR146 Cells. 32nd Ann. Meet. Exp. Control. Rel. Soc. 378.
- Theodore, J., Robin, E.D., Gaudio, R., Acevedo, J., **1975**. Transalveolar transport of large polar solutes (sucrose, inulin, and dextrans). *Am. J. Physiol.*, 229, 989-996.
- Tice, T.R., Gilley, R.M., **1985**. Preparation of injectable controlled microcapsules by a solvent-evaporation process. *J. Control. Release*, 2, 343-352.
- Timsina, M.P., Martin, G.P., Marriott, C., Ganderton, D., Yianneskis, M., **1994**. Drug delivery to the respiratory tract using dry powder inhalers. *Int. J. Pharm.*, 101, 1-13.
- Todo, H., Okamoto, H., Iida, K., Danjo, K., **2001**. Effect of additives on insulin absorption from intratracheally administered dry powders in rats. *Int. J. Pharm.*, 220, 101-110.
- Tokumitsu, H., Ichikawa, H., Saha, T.K., Fukumori, Y., Block, L.H., **2000**. Design and preparation of gadolinium-loaded chitosan particles for cancer neutron capture therapy. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 10, 39-49.
- Torché, A.M., Le Corre, P., Albina, E., Jestin, A., Le Verge, R., **2000**. PLGA microspheres phagocytosis by pig alveolar macrophages: Influence of poly(vinyl alcohol), concentration, nature of loaded-protein and copolymer nature. *J. Drug Target*, 7, 343-354.
- Tripathi, K.P., Singh, J., **1992**. Aminophylline targeting to lung: optimization of the size and drug loading of albumin microspheres. *J. Microencapsul.*, 9, 229-235.
- United States Pharmacopeia. 2000. Physical test and determinations: Aerosols, metered dose inhalers and dry powder inhalers. *United States Pharmacopeia* 24, 1895-1912.
- Vanbever, R. Mintzes, J.D., Wang, J., Nice, J., Chen, D., Batycky, R., Langer, R., Edwards, D.A., **1999a**. Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation. *Pharm. Res.*, 16, 1735-1742.
- Vanbever, R., Ben-Jebria, A., Mintzes, J.D., Langer, R., Edwards, D.A., **1999b**. Sustained release of insulin from insoluble inhaled particles. *Drug Dev. Research*, 48, 178-185.

- Videira, M.A., Botelho, M.F., Santos, A.C., Gouveia, L.F., De Lima, P., Almeida, A.J., **2002**. Lymphatic uptake of pulmonary delivery radiolabelled solid lipid nanoparticles. *J. Drug Target.*, 10, 607-613.
- Vidgren, M., Karkkainen, A., Karjalainen, P., Nuutinen, J., Paronen, P., **1988**. In vitro and in vivo deposition of drug particles inhaled from pressurized aerosol and drug powder inhaler. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 14, 2649-2665.
- Vila, A., Sánchez, A., Tobio, M., Calvo, P., Alonso, M.J., **2002**. Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Control. Release*, 78, 15-24.
- Vinod, A.P., Mehta, R.C., Deluca, P.P., **1997**. In vitro and in vivo respirable fractions of isopropanol treated PLGA microspheres using dry powder inhaler. *Int. J. Pharm.*, 151, 175-182.
- Wall, D.A., Pierdomenico, D., Wilson, G., **1993**. An in vitro pulmonary epithelial system for evaluating peptide transport. *J. Control. Release*, 24, 227-235.
- Wall, D.A., Smith, P.L., **1997**. Inhalation therapy for growth hormone deficiency. En: Adjei, A.K., Gupta, P.K., (Eds.), *Inhalation delivery of therapeutics peptides*. Marcel Dekker, New York, pp. 453-470.
- Wang, J.A., Ben-Jebria, A., Edwards, D.A., **1997**. Controlled-release inhalation aerosols. En: Dalby, R.N., Byron, P.R., Farr, S.J., (Eds.), *Respiratory Drug Delivery*, vol.VI, IL:Interpharm, Buffalo Grove, pp. 187-192.
- Wang, L.Y., Toledo-Velasquez, D., Pan, W.F., Schweger-Berry, D., Ma, J.K.H., Rojanasakul, Y., **1993**. Transport and hydrolysis of enkephalins in cultured alveolar epithelial monolayers. *Pharm. Res.*, 10, 1662-1667.
- Washington, N., Wilson, C.G., Washington, C., **1989**. Pulmonary drug delivery. En: Washington, N., Wilson, C.G., Washington, C., (Eds.), *Physiological Pharmaceutics: Biological barriers to drug absorption*, Ellis Horwood Limited, Chichester, pp. 155-178.
- Welty-Wolf, K.E., Simonson, S.G., Huang, Yuh-Chin T., Kantrow, S.P., Carraway, M.S., Chang, Ling-Yi, Crapo, J.D., Piantadosi, C.A., **1997**. Aerosolized manganese SOD decreases hyperoxic pulmonary injury in primates. II. Morphometric analysis. *J. Appl. Physiol.*, 83, 559-568.
- Williams, M.C., **1984**. Endocytosis in alveolar type II cells: effect of charge and size of tracer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 6054-6058.
- Williams, R.O., Barron, M.K., Alonso, M.J., Remuñán-López, C., **1998**. Investigation of a pMDI system containing chitosan microspheres and P134a. *Int. J. Pharm.*, 174, 209-222.
- Wissing, S.A., Muller, R.H., **2001**. Solid lipid nanoparticles (SLN): a novel carrier for UV blockers. *Pharmazie*, 56, 783-786.
- Yamahara, H., Morimoto, K., Lee, V.H.L., Kim, K., **1994a**. Effects of protease inhibitors on vasopressin transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm. Res.*, 11, 1617-1622.
- Yamahara, H., Lee, V.H.L., Kim, K., **1994b**. Fate of insulin during transit across rat alveolar epithelial cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 40, 294-298.
- Yamamoto, H., Kuno, Y., Sugimoto, S., Takeuchi, H., Kawashima, Y., **2005**. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J. Control. Release*, 102, 373-381.
- Yan, N., Zhang, M., Ni, P., **1994**. Study on polyamide microcapsules containing oily liquids. *J. Microencapsul.*, 43, 1569-1573.

Yang, S.C., Lu, L.F., Cai, Y., Zhu, J.B., Liang, B.W., Yang, C.Z., **1999**. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J. Control. Release*, 59, 299-307.

Yang, X., Joseph, K.A., Malanga, C.J., Rojanasakul, Y., **2000**. Characterization of proteolytic activities of pulmonary alveolar epithelium. *Int. J. Pharm.*, 195, 93-101.

Zhang, Q., Liao, G., Wei, D., Nagai, T., **1998**. Increase in gentamicin uptake by cultured mouse peritoneal macrophages and rat hepatocytes by its binding to polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 164, 21-27.

Zeng, X.M., Martin, G.P., Marriott, C., **1994**. Tetrandrine delivery to the lung: The optimization of albumin microspheres preparation by central composite design. *Int. J. Pharm.*, 109, 135-145.