

2. Nanosistemas a base de poliésteres

F. ROCHA FORMIGA, E. ANSORENA, A. ESTELLA-HERMOSO
DE MENDOZA, E. IMBULUZQUETA, D. GONZÁLEZ,
M. J. BLANCO PRIETO

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra*

La utilización de nanopartículas es una importante área de la investigación en el campo de la liberación de fármacos, ya que estos sistemas permiten dirigir una amplia variedad de moléculas a los distintos tejidos liberándolos de manera sostenida en el tiempo. Además, el uso de nanopartículas minimiza la degradación del principio activo, incrementa su semivida en el interior del órgano a tratar y disminuye su toxicidad.

El término nanopartícula engloba las nanocápsulas y nanoesferas. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que el fármaco se localiza en el interior de la partícula, generalmente disuelto en un vehículo oleoso. Las nanoesferas, en cambio, son sistemas de tipo matricial donde el fármaco se suele encontrar encapsulado en el interior de la matriz (Figura 2.1).

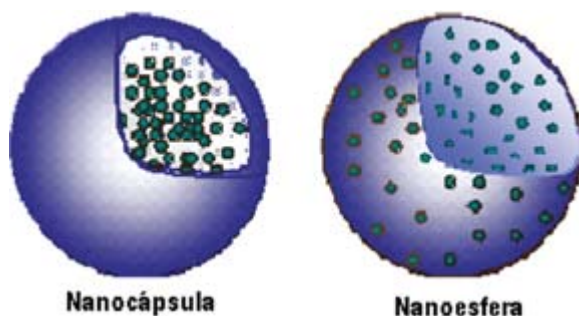


FIGURA 2.1. Dibujo esquemático de una nanocápsula y una nanoesfera.

Dentro de la nanotecnología, la búsqueda de polímeros para aplicaciones biomédicas ha experimentado un importante avance en las últimas tres décadas. Sobre todo, el estudio y desarrollo de polímeros sintéticos como componentes importantes de matrices utilizadas como vectores de moléculas terapéuticas. Dentro de los polímeros sintéticos destacan los poliésteres debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Los más utilizados son el ácido láctico (PLA) y los copolímeros formados por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico (PLGA), ya que han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral. Además, modificando el peso molecular, su grado de hidrofilia y la proporción de cada uno de los polímeros se puede controlar la velocidad de degradación de los mismos, el grado de encapsulación y el de liberación del fármaco o principio activo (1-3). Otros polímeros empleados para la obtención de nanopartículas son la poli- ϵ -caprolactona (4), el poli- β -hidroxibutirato (5) y el ácido β -l-málico (6). El polímero empleado para formular las nanopartículas afecta de manera importante a las propiedades y estructura de las partículas y condiciona sus posibles aplicaciones, así como la vía de administración (7).

Con el fin de obtener mejores eficacias de encapsulación los poliésteres han sido empleados combinados con otros polímeros hidrofílicos lo que permite modificar las propiedades de la superficie de las nanopartículas obtenidas (8, 9). En este sentido, también se han llevado a cabo combinaciones de los poliésteres con el polivinil alcohol (PVA) con el fin de estabilizar las nanopartículas obtenidas (10, 12).

Una gran variedad de fármacos pueden ser administrados utilizando vectores nanoparticulados. Así, las nanopartículas se pueden emplear para la liberación de sustancias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Además pueden ser formuladas para que su liberación sea dirigida a determinados tejidos u órganos, como por ejemplo al cerebro, pulmones, hígado, bazo, sistema linfático, etc. Por lo tanto, las ventajas de este tipo de nanopartículas formuladas con poliésteres son las de ofrecer una protección al principio activo en las condiciones biológicas y permitir una liberación sostenida en el tiempo evitando así administraciones repetidas, lo que conlleva una mayor comodidad para el paciente.

Las nanopartículas formuladas utilizando poliésteres tienen un gran número de aplicaciones tanto para fines diagnósticos como de tratamiento. En cuanto al diagnóstico, se han encapsulado agentes de contraste («*quantum dots*») para su utilización en imágenes de resonancia magnética o para imagen óptica. Dentro del diagnóstico por imagen, también se han empleado las nanopartículas en medicina nuclear y en la obtención de imágenes por ultrasonidos (12, 14).

Entre las distintas moléculas encapsuladas en nanopartículas formuladas con poliésteres se encuentran fármacos antitumorales, antígenos, péptidos y proteínas, genes, etc. para el tratamiento y prevención de distintas enfermedades (13, 26).

En el presente capítulo, se resumen y comentan las técnicas de preparación y de caracterización de nanopartículas formuladas a partir de poliésteres, así como sus aplicaciones más comunes.

POLÍMEROS

Los sistemas de transporte a base de materiales poliméricos en forma de nanopartículas requieren polímeros biocompatibles y biodegradables. Sin embargo, el riesgo potencial de infecciones e inmunogenicidad inducidas por sustancias poliméricas de origen animal o vegetal llevó a la necesidad de utilizar materiales sintéticos para reemplazar los polímeros naturales (27). Consecuentemente, una gran variedad de polímeros sintéticos ha sido desarrollada en los últimos quince años, teniendo en cuenta el requisito básico para materiales de aplicación biomédica: estos polímeros deben ser completamente degradados y eliminados del organismo. Los poliésteres son un grupo particularmente atractivo para el desarrollo de sistemas poliméricos nanoparticulados de liberación controlada por su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Además, algunos miembros de este grupo de polímeros presentan baja inmunogenicidad y pueden ser combinados con una amplia variedad de fármacos y otras moléculas de interés terapéutico (8, 28).

Ácido poli-láctico (PLA)/Ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA)

Entre los poliésteres utilizados en el desarrollo de nanopartículas destacan los poliésteres alifáticos, formados por una sucesión, bien de unidades monoméricas de ácido láctico o bien de dímeros láctico-co-glicólico. Estos biopolímeros han sido aprobados por la FDA para elaboración de sistemas de liberación de fármacos y otros usos biomédicos como la fabricación de suturas biodegradables (29, 30). El L-PLA y el PLGA son compuestos que corresponden respectivamente al homopolímero lineal del ácido poli-L-láctico y a copolímeros lineales del D,L ácido láctico y glicólico, los cuales se pueden encontrar en proporciones monoméricas variables. La copolimerización del PLGA puede ser llevada a cabo por dos rutas distintas de síntesis: 1) policondensación del ácido láctico y del ácido glicólico a temperatura superior

a 120 °C, o por debajo de esta temperatura en presencia de catalizadores, obteniéndose así PLGA de bajo peso molecular (PM < 10.000 Da) (31); 2) polimerización vía apertura de los dímeros cíclicos de los dos respectivos ácidos, resultando en copolímeros de alta masa y mejores propiedades mecánicas (32). Por otro lado, el peso molecular de PLA/PLGA es un parámetro que influye en la homogeneidad de la muestra. En general, polímeros de elevado peso molecular dan lugar a sistemas nanoparticulados con un bajo índice de polidispersión (33).

Las nanopartículas biodegradables de PLGA han sido utilizadas como vectores para la liberación controlada de proteínas, péptidos, vacunas, genes, factores de crecimiento, etc. (8). El PLGA presenta ventajas y desventajas como biomaterial para la encapsulación de macromoléculas terapéuticas (34). La degradación del PLA/PLGA, que ocurre por hidrólisis no enzimática, puede dar lugar a una acumulación de sus monómeros ácidos, lo que resulta en la reducción del pH local y consecuente desnaturalización de proteínas encapsuladas (30, 35, 36). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de toxicidad de sus productos de degradación y su modulable velocidad de degradación hacen del PLGA el poliéster más utilizado en formulaciones nanoparticuladas de aplicación terapéutica (37-41). Otra importante ventaja del PLGA sobre el L-PLA, es que al presentar una velocidad de degradación más rápida, la probabilidad de que ocurran reacciones adversas debido a fragmentos cristalinos liberados por estos últimos, es menor (42).

Poli-ε-caprolactona (PCL)

La poli-ε-caprolactona (PCL) ha sido utilizada en la última década para encapsular principios activos de diferentes grupos farmacológicas. Además de su adecuada biocompatibilidad y baja inmunogenicidad, la PCL presenta algunas características particulares que justifican su uso como biomaterial en el campo de la liberación controlada de fármacos. Su biodegradación más lenta, en comparación con el PLGA, aumenta la semivida biológica de las moléculas encapsuladas, lo que permite su uso en formulaciones nanoparticuladas para la administración de principios activos para los cuales es necesaria una liberación mantenida durante periodos de tiempo prolongados. Por otro lado, la PCL genera durante su degradación una cantidad menor de productos ácidos comparada con el PLGA (4). Nanopartículas preparadas con PCL han mejorado la biodisponibilidad ocular de cartelol (43), indometacina (44) y aceclofenaco (45).

Poli (β -hidroxibutirato) (PHB)

El poli (β -hidroxibutirato) (PHB) es otro poliéster biodegradable, lineal, estable a temperatura ambiente y semicristalino, con una velocidad de degradación más lenta que otros poliésteres empleados en formulaciones de nanopartículas. Aunque no sea muy utilizado en tecnología farmacéutica, el PHB puede facilitar la liberación de fármacos de bajo peso molecular debido a la penetración de agua y formación de poros en la matriz polimérica nanoparticulada (5). Mezclas de PHB y L-PLA pueden presentar ventajas frente al L-PLA puro y se utilizan para optimizar la liberación controlada de moléculas activas a partir de formulaciones nanoparticuladas (46). Una combinación más común es la del poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), un polímero biodegradable que ha sido utilizado en la obtención de nanocápsulas de L-asparaginasa y otras enzimas utilizadas en la terapia del cáncer. El PHBV de bajo peso molecular favoreció el aumento de la eficacia de encapsulación y de la actividad enzimática de dichas enzimas (47).

Ácido poli (β ,L-málico) (PMLA)

El ácido poli (β ,L-málico) (PMLA) fue sintetizado por vía química antes de que se conociera su existencia natural. La mayor parte de la investigación sobre este poliéster funcionalizado con grupos carboxílicos se ha centrado en la síntesis química para aplicaciones biomédicas. Nanopartículas de PMLA han sido preparadas con el objetivo de encapsular proteínas de distintos puntos isoeléctricos. La quimiotripsina, por ejemplo, ha sido encapsulada en nanopartículas de PMLA manteniéndose su actividad enzimática durante períodos de tiempo prolongados comparados con la enzima libre (6).

La Tabla 2.1 resume los principales poliésteres utilizados en la fabricación de sistemas nanoparticulados para la liberación controlada de fármacos y moléculas bioactivas.

Se han empleado distintas combinaciones de polímeros principalmente con dos objetivos: modificar las propiedades de superficie de las nanopartículas y disminuir la degradación de las moléculas encapsuladas (8, 48). Mediante la modificación del PLGA se puede optimizar la estabilidad del fármaco encapsulado, su perfil de liberación y/o dirigir las nanopartículas a una diana específica. En este contexto, los poliésteres han sido combinados con polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG) y el polióxido de etileno (PEO) (9, 49). La

Tabla 2.1. *Poliésteres utilizados como matriz polimérica para encapsular distintas moléculas en nanopartículas. PLA: ácido poli-láctico; PGA: ácido poli-glicólico; PLGA: ácido poli-láctico-co-glicólico; PCL: poli-ε-caprolactona; PHB: poli (β-hidroxibutirato); PHBV: poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato; PMLA: ácido poli (BL-málico).*

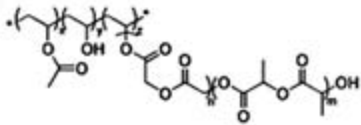
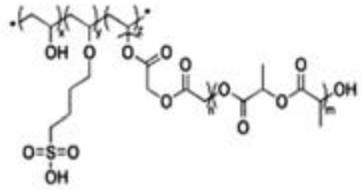
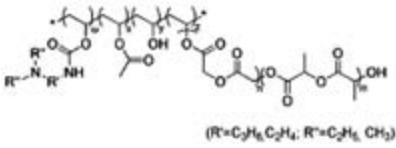
<i>Poliéster</i>	<i>Estructura química</i>
PGA	$\left[\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{---CH-C-O---} \end{array} \right]_n$
PLGA	$\left[\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{---CH-C-O---} \end{array} \right]_n$
PCL	$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O} \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \text{---CH-C-O-CH}_2\text{-C-O---} \end{array} \right]_n$
PHB	$\left[\text{O}-(\text{CH}_2)_5\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C} \right]_n$
PHB	$\left[\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{---C---C---O---} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$
PMLA	$\left[\begin{array}{c} \text{HOOC} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{---O---C---} \end{array} \right]_n$

modificación superficial de la partícula con PEG, proceso comúnmente denominado «pegilación», conlleva importantes cambios en las propiedades físico-químicas de las nanopartículas, como la neutralización de su potencial zeta y la reducción de la hidrofobicidad superficial (48, 50, 51). Senthilkumar y col. (49) no observaron cambios importantes en los tamaños de nanopartículas de PLGA pegiladas con PEG de distintos pesos moleculares, en comparación con nanopartículas de PLGA no pegiladas. Las cadenas de PEG forman una barrera estérica en la superficie de las nanopartículas, impidiendo la opsonización y el re-

conocimiento por parte de los macrófagos, que resultaría en la eliminación de las nanopartículas por el sistema retículo endotelial en pocos segundos tras su administración intravenosa (4, 48, 50). Por lo tanto, la pegilación incrementa la semivida biológica de las moléculas encapsuladas en las nanopartículas. Así se ha observado que nanopartículas pegiladas de docetaxel posibilitan una mayor acumulación del antineoplásico en tumores sólidos en ratón (49). Danhier y col. (52) observaron un mayor efecto inhibitorio inducido por el paclitaxel encapsulado en nanopartículas de PLGA pegiladas sobre el crecimiento tumoral en hígado de ratón, comparado con la administración de Taxol®. Nanopartículas fabricadas con copolímeros hidrofílicos presentaron mayor tiempo de permanencia en sangre y una reducida acumulación en el hígado de ratón (53). Además, la capa de PEG mejoró la estabilidad de nanopartículas de PLA en el medio gastrointestinal, facilitando el transporte de la toxina tetánica a través de las mucosas intestinal y nasal (54).

Como se ha mencionado anteriormente, la conjugación del PLGA con otros polímeros también ha sido utilizada como estrategia para estabilizar macromoléculas terapéuticas en nanopartículas. En este sentido, los poliésteres de arquitectura molecular ramificada (PAMR) basados en la conjugación del PLGA con el alcohol polivinílico (PVA) han sido desarrollados y clasificados en tres generaciones, de acuerdo con los distintos grupos moleculares incorporados al PVA (Tabla 2.2). Los PAMR se han empleado en la fabricación de vectores nanoestructurados con el objetivo de optimizar las propiedades del PLGA y su capacidad de modular la liberación y la estabilidad de macromoléculas encapsuladas. El carácter anfifílico y la hidrofiliidad de esta clase de polímeros son importantes ventajas para la encapsulación de macromoléculas, como péptidos o DNA (55). La cadena principal del PVA puede ser modificada por la asociación de grupos sulfobutilo o amino, lo que permite la obtención de PAMR con cargas positivas o negativas. Así los grupos amino producen poliésteres ramificados cargados positivamente, que facilita la encapsulación del DNA en nanopartículas en el campo de la vacunación y terapia génica. Las interacciones electrostáticas con grupos amino terciarios probablemente estabilizan el DNA en el interior de la matriz polimérica, lo que permite la encapsulación de dicha macromolécula en nanopartículas del PAMR (55, 57). Oster y col. (58) investigaron el grado de sustitución por grupos amino en la estructura polimérica y su relación con las propiedades de las nanopartículas de DNA. Dichas partículas presentaron tamaños entre 150 y 350 nm (grado de sustitución por grupos amino de 4 % y 11 % respectivamente), mientras que las nanopartículas preparadas con PLGA empleando las mismas condiciones presentaron un tamaño de 200 nm o superior. Jung y col. (59) observaron un aumento significativo del contenido de la toxina tetánica encapsulada en

Tabla 2.2. *Distintas generaciones de poliésteres de arquitectura molecular ramificada*

<i>Poliéster ramificado</i>	<i>Estructura química</i>	<i>Ventajas en sistemas nanoparticulados</i>
PVA-g-PLGA (primera generación)		Adecuado para encapsular proteínas para la administración parenteral (8). Mayor eficiencia de encapsulación de proteínas comparada con el PLGA.
Sulfobutil-PVA-g-PLGA (segunda generación)		Sistema polimérico para la obtención de un adyuvante nanoparticulado(59).
Amino-PVA-g-PLGA (tercera generación)		Variabilidad en la velocidad de biodegradación mediante modificación del polímero Alta eficiencia de encapsulación de DNA (55) e insulina (64) por mecanismos electrostáticos.

nanopartículas preparadas con un PAMR de segunda generación (6 % p/p), comparado con su contenido (0,5 % p/p) en nanopartículas de PLGA. La mayor o menor elongación de las cadenas laterales del PLGA también resulta en modificaciones en la flexibilidad del nuevo sistema polimérico, una característica que puede ser adaptada a las necesidades de múltiples fármacos y/o moléculas bioactivas. Además, la velocidad de biodegradación puede ser manipulada mediante modificación de la arquitectura molecular del polímero, lo que permite obtener poliésteres ramificados con un rango de semivida de varias horas a varias semanas (55). Sin embargo, a pesar de que los PAMR son poliésteres interesantes para la formulación de nanopartículas, es necesaria una mayor investigación sobre sus mecanismos de biodegradación y su perfil toxicológico (8).

La PCL también ha sido utilizada en el diseño de polímeros anfifílicos hiper ramificados y funcionalizados para la vectorización de antineoplásicos me-

dian­te nanopar­ti­cu­las (60). Ade­más, com­bi­na­cio­nes de PCL con otros poli­és­te­res y con otros tipos de polí­me­ros han sido em­plea­das para en­capi­su­lar nimlo­di­pi­no (41), ato­va­cuo­na (61), ta­mo­xi­fe­no (62), ci­clo­sporina A (63) y otras molé­cu­las te­ra­péu­ti­cas en nanopar­ti­cu­las.

MÉTODOS DE PREPARACIÓN

Durante las últi­mas dé­ca­das, se han de­sar­rolla­do va­rias téc­ni­cas para la for­mu­la­ción de nanopar­ti­cu­las. Su fabri­ca­ción ha evo­lu­cio­na­do prin­ci­pal­men­te en tres as­pec­tos: 1) bús­que­da de com­ponen­tes me­nos tóxi­cos; 2) sim­pli­fi­ca­ción del pro­ce­so para fabri­ca­ción a nivel in­dus­tri­al; y 3) op­ti­mi­za­ción de las téc­ni­cas en cuanto a ren­di­mien­to y efi­ca­cia de en­capi­su­la­ción (65).

Los mé­to­dos para la pre­pa­ra­ción de nanopar­ti­cu­las son dis­ti­nos de­pen­diendo de si par­ti­mos de polí­me­ros pre­for­ma­dos o de sus monó­me­ros (66).

En lo re­fe­ren­te a estos últi­mos, se han pro­pues­to di­fe­ren­tes mé­to­dos para pre­pa­rar nanopar­ti­cu­las de com­pues­tos na­tu­ra­les. Entre estos mé­to­dos en­con­tra­mos aque­llos que im­pli­can el uso de calor o so­ni­ca­ción, e­le­va­dos vo­lú­me­nes de disol­ven­tes orgá­ni­cos o acei­tes, y agen­tes quí­mi­cos re­ti­cu­lan­tes que pre­sen­tan to­xi­ci­dad. Ade­más, la in­cer­ti­dum­bre de la fuente y pu­reza de las ma­cro­mo­lé­cu­las y el po­ten­cial anti­gé­ni­co que pre­sen­tan re­stri­ngen el uso de este tipo de nanopar­ti­cu­las (65). Incon­ve­nien­tes si­mi­la­res se han de­scri­to para nanopar­ti­cu­las po­li­mé­ricas pre­pa­ra­das por po­li­me­ri­za­ción de monó­me­ros. Ade­más de no ser bio­de­gra­da­bles, tanto las nanopar­ti­cu­las for­ma­das a par­tir de esos monó­me­ros como sus re­si­duos monomé­ri­cos u oli­go­mé­ri­cos pue­den re­sul­tar tóxi­cos. Por otro lado, si se em­plea ra­diación para in­du­cir la po­li­me­ri­za­ción, pue­den tener lugar re­ac­cio­nes de en­tre­cru­za­mien­to entre el polí­me­ro y el prin­ci­pio ac­ti­vo o de­gra­da­ción de los com­ponen­tes de la nanopar­ti­cu­la (7), dis­mi­nuyen­do así la ac­ti­vi­dad del sistema.

Los prin­ci­pa­les mé­to­dos para pre­pa­rar nanopar­ti­cu­las a par­tir de poli­és­te­res son: evo­ra­ción del disol­ven­te, nano­pre­ci­pi­ta­ción, «*salting out*», di­fu­sión del disol­ven­te y fluí­dos su­per­crí­ti­cos.

Evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión

Este mé­to­do se basa en el pro­ce­di­mien­to pa­ten­ta­do por Van­der­hoff y col. (67) para la pre­pa­ra­ción de pseu­do­lá­tex o lá­tex arti­fi­cial. Es el mé­to­do más uti­-

lizado para formar nanopartículas poliméricas a partir de poliésteres y se basa en la emulsificación de una solución orgánica que contiene el polímero en una solución acuosa de un agente tensioactivo o estabilizante seguida de la evaporación del disolvente orgánico. El polímero se disuelve en un disolvente apropiado (p. ej. acetato de etilo, cloroformo, diclorometano). La fase interna de la emulsión se añade sobre la fase externa acuosa, en la que se disuelve un agente tensioactivo que proporciona estabilidad a la emulsión. La emulsificación tiene lugar mediante agitación por cizalladura para reducir el tamaño de la gotícula de la emulsión (directamente relacionada con el tamaño final de las nanopartículas (68)). A este proceso de emulsificación le sigue la evaporación del disolvente orgánico, que provoca la precipitación del polímero y la formación de las nanopartículas (8, 68, 69). Como paso final, la suspensión de las nanopartículas formadas se somete a una serie de lavados con agua purificada para eliminar el exceso de agente estabilizante. Todo el proceso aparece esquematizado en la Figura. 2.2.

La mayoría de disolventes empleados en esta técnica son organoclorados, principalmente diclorometano y cloroformo, por su inmiscibilidad en agua, fácil emulsificación, propiedades de solubilización y bajo punto de ebullición. Sin embargo, la desventaja que presentan estos disolventes es su toxicidad (clase 2 en las guías ICH para disolventes residuales (70)), por lo que siempre se debe verificar el contenido residual de dichos disolventes en la formulación final.

El PVA ha sido el agente estabilizante más empleado a la hora de preparar nanopartículas biodegradables a partir de poliésteres. Además, es uno de los pocos que previene la agregación de partículas durante los pasos post-preparativos, como pueden ser la purificación y el liofilizado. Se ha observado que el incremento en la concentración del agente estabilizante produce una disminución del tamaño de las nanopartículas para concentraciones de PVA inferiores al 10%, punto a partir del cual el tamaño empieza a aumentar (71).

Los polímeros más empleados en esta técnica son el PLA (72, 73), el PLGA (8, 74), la PCL (4, 75) y el PHB (76). La concentración y peso molecular del polímero a utilizar también afectarán a la formación de nanopartículas. En el caso del PLGA, el más empleado de los poliésteres, el peso molecular presenta un efecto inverso sobre el tamaño y la eficiencia de encapsulación. Se pueden preparar nanopartículas de aproximadamente 100 nm con polímeros de bajo peso molecular, sin embargo, se reduce de la eficiencia de encapsulación del fármaco (65). Por otra parte, un aumento de la concentración de polímero aumenta la eficiencia de encapsulación pero también el tamaño de las nanopartículas. El rango óptimo de concentración de polímero oscila entre un 2% y un 5% (p/v) (77).

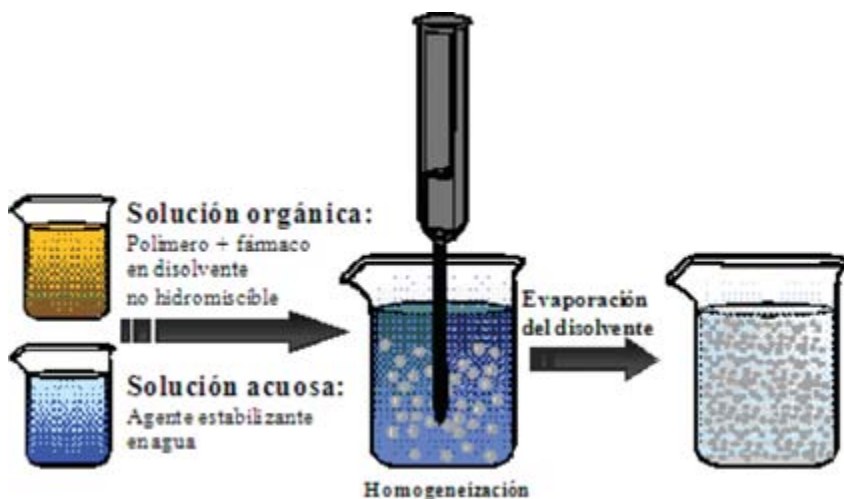


FIGURA 2.2. Representación esquemática del método de evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión.

A pesar de que la ultrasonificación ha sido ampliamente empleada como procedimiento homogeneizador, presenta una serie de inconvenientes tales como posible contaminación de la formulación con titanio, elevado índice de polidispersión del tamaño de las nanopartículas, inducción de reacciones químicas de degradación y dificultad de elaboración a gran escala (65).

Las emulsiones simples, orgánico en acuoso (O/A) o acuoso en orgánico (A/O) y las emulsiones múltiples (A/O/A) pueden emplearse para incluir principios activos de distintas características. La emulsión O/A suele emplearse para la encapsulación de principios activos hidrófobos o agentes de contraste (14), mientras que la emulsión múltiple A/O/A es más usada para la encapsulación de principios activos hidrófilos. La formación de la emulsión es un aspecto fundamental del método, ya que puede considerarse que el tamaño de la gotícula que se forma en la emulsión está directamente relacionado con el tamaño final de la partícula (68).

Nanoprecipitación

Esta técnica también recibe el nombre de «sustitución del disolvente» (78). En este proceso, el polímero, el fármaco, y, de manera opcional, un estabilizante lipofílico se disuelven en un disolvente polar miscible en agua, como acetona o etanol (8). Esta solución se adiciona sobre un no-solvente bajo agitación magnética, entendiéndose

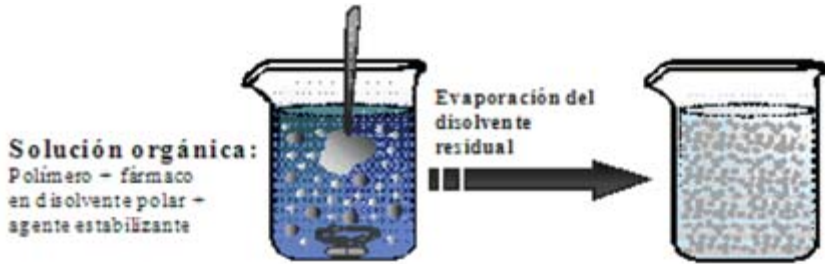


FIGURA 2.3. Representación esquemática del método de nanoprecipitación.

dose por «no-solvente» aquel disolvente que es miscible con el disolvente del polímero y en el cual el polímero es insoluble. A medida que se adiciona el no-solvente se provoca la insolubilización del polímero, el cual precipita. Generalmente, el no-solvente está constituido por una solución acuosa que contiene un agente estabilizante, por ejemplo, PVA (79) o poloxámero 188 (75). Las nanopartículas se forman instantáneamente por una rápida difusión del disolvente al medio acuoso, que se elimina posteriormente de la suspensión sometiénola a presión reducida (Figura 2.3).

El mecanismo de formación de las partículas por este método se explica por las turbulencias interfaciales que se generan durante la sustitución del disolvente. Aquí, se observa una difusión violenta debida a la miscibilidad de los disolventes. Las gotículas de disolvente, de tamaño nanométrico, son eliminadas de la interfase (65, 80). Estas gotículas se estabilizan rápidamente por el agente tensioactivo, hasta que se da la completa difusión del disolvente y, por tanto, la precipitación del polímero. La utilidad de esta técnica está limitada a disolventes miscibles en agua, en los cuales el ritmo de difusión es lo suficientemente rápido como para producir la emulsificación espontánea. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es la dificultad de elección del sistema fármaco/polímero/disolvente/no-solvente en el cual se formen las nanopartículas. Además, esta técnica únicamente es útil para principios activos solubles en este tipo de disolventes como pueden ser la indometacina, ciclosporina A o 5-fluorouracilo (63, 80).

El tamaño de las partículas y el rendimiento de fabricación se ven afectados por la concentración del polímero. Generalmente se usan concentraciones entre 1% y 10% (p/v) de polímero. Este comportamiento se atribuye al incremento en la viscosidad de la fase orgánica. Niwa y col. (81) mostraron que el rendimiento de fabricación de las nanopartículas de PLGA aumentaba con el incremento en la concentración del agente estabilizante. Distintos autores obtuvieron resultados similares para nanoesferas de PCL, usando poloxámero 188 como agente estabilizante (82, 83). Recientemente, se ha demostrado que el diá-

metro medio de las nanopartículas de PLGA aumenta al incrementar la concentración de PVA (84). Este efecto se relaciona con las elevadas concentraciones de PVA (2-6% p/v), que aumentan la viscosidad del medio acuoso, disminuyendo así la velocidad de difusión del disolvente. El peso molecular del PVA también influye de manera decisiva en el tamaño de partícula, rendimiento de la formulación y redispersión de las partículas liofilizadas (77). Así, el PVA de alto peso molecular es útil para aumentar el rendimiento del proceso, así como para obtener una homogeneidad en tamaño y una mejor redispersión de las partículas liofilizadas, a diferencia del PVA de bajo peso molecular (12).

El método de nanoprecipitación permite la preparación de nanocápsulas cuando se añade un pequeño volumen de un aceite no tóxico a la fase orgánica (85). En este caso, hay que tener en cuenta dos aspectos importantes en la selección del aceite: i) no debe degradar el polímero, y ii) debe ser un buen solvente para el fármaco de manera que no favorezca una rápida liberación y reduzca la cristalización espontánea del fármaco durante su preparación. Teniendo en cuenta la naturaleza lipídica de las cavidades centrales de las nanocápsulas, se han descrito elevadas eficacias de encapsulación de fármacos lipófilos como octilmetoxicinamato, indometacina o diclofenaco (83, 86-88).

Con respecto al método de evaporación del disolvente, la nanoprecipitación presenta la ventaja de que, además de ser un método apropiado para encapsular principios activos hidrofóbicos, se consume menor energía durante el proceso de formación de las nanopartículas, ya que únicamente requiere una agitación leve en lugar de sonicación o microfluidización (77). Por otro lado, presenta una serie de desventajas como son: 1) el requerimiento de elevadas cantidades de agua para la formación de las nanopartículas; 2) tiempos prolongados de agitación; 3) el tamaño es sensible a la concentración de polímero si no se utiliza una elevada agitación por cizalladura para la reducción del mismo; y 4) baja eficacia de encapsulación de principios activos hidrófilos, por la elevada tendencia a la difusión del activo a la fase acuosa (77). Sin embargo, recientemente este método ha sido modificado para lograr encapsular principios activos hidrófilos, combinando la técnica de evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión doble con la técnica de la difusión del disolvente (89, 90).

«Salting out»

Este método se basa en la separación de un disolvente hidromiscible de una solución acuosa rica en electrolitos (91). La acetona suele ser el disolvente elegido debido a sus características de solubilización y su buena separación de so-

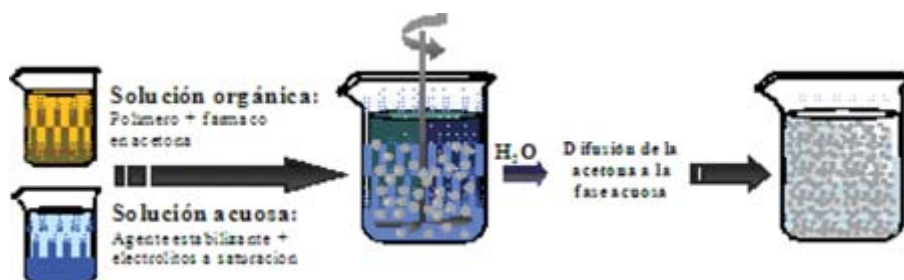


FIGURA 2.4. Representación esquemática del método «salting out».

luciones acuosas con los electrolitos (o agentes «*salting out*») (92, 93). El polímero y el fármaco se disuelven en acetona, y esta solución se emulsifica bajo una fuerte agitación mecánica en un gel acuoso que contiene los electrolitos y un estabilizante (94). Esta emulsión O/A se diluye con un volumen suficiente de agua o de soluciones acuosas para potenciar la difusión de la acetona hacia la fase acuosa, induciendo así la formación de nanopartículas. El disolvente y los electrolitos se eliminan por filtración de flujo transversal. Los pasos para este procedimiento se describen en la Figura. 2.4.

El mecanismo de formación de las nanopartículas se asemeja en cierto modo a la nanoprecipitación. Así, la difusión de la acetona desde las gotículas durante el paso de dilución puede generar turbulencias en la interfase y la precipitación del polímero en forma de nanopartículas.

La elección correcta del electrolito es muy importante porque juega un importante papel en la eficacia de encapsulación. Ejemplos de electrolitos para la acetona empleados en este método son el cloruro de magnesio, cloruro sódico, cloruro cálcico y acetato magnésico; y un no-electrolito, la sacarosa. Así, por ejemplo, la eficacia de encapsulación de la savoxepina puede aumentarse empleando una sal básica como acetato magnésico en lugar de sales neutras o ácidas (93).

Con respecto al agente estabilizante, se han empleado el PVA (93, 95), la polivinil pirrolidona (PVP) (95) y la hidroxietilcelulosa (77, 95), observándose que un incremento en la concentración de agente estabilizante en la fase externa de la emulsión produce una disminución notable del tamaño de partícula, mientras que un incremento en la velocidad de agitación y concentración de polímero implica una disminución menor del tamaño (93).

Una de las principales ventajas de esta técnica es la posibilidad de incorporación de altas cantidades tanto de polímero como de fármaco, ya que el tamaño medio de las nanopartículas no es tan dependiente de la concentración de

polímero empleada, a diferencia de lo que ocurre en otros métodos. Así, la concentración óptima de polímero puede alcanzar hasta 20% (96). Otras ventajas son los excelentes rendimientos del proceso, la facilidad de adaptación de la fabricación a gran escala y la posibilidad de encapsular proteínas y demás principios activos termolábiles, debido a que no se utilizan elevadas temperaturas. En contrapartida, esta técnica está exclusivamente limitada a fármacos lipofílicos, electrolitos que permitan la separación de las fases evitando la precipitación y agentes estabilizantes compatibles con soluciones acuosas saturadas y que no coacervan en presencia del disolvente, además de una serie de intensos lavados para eliminar los electrolitos (80, 92).

Difusión del disolvente

Este método podría considerarse una modificación de la técnica «salting out», evitando el uso de sales y, por tanto, una serie de intensos pasos de purificación. Consiste en el uso de un disolvente parcialmente miscible en agua, que previamente se satura con agua para asegurar el equilibrio termodinámico entre ambos líquidos (77, 80). El polímero se disuelve en el disolvente saturado con agua, y esta fase orgánica se emulsifica, bajo agitación vigorosa, en una solución acuosa que contiene un agente estabilizante. La posterior adición de agua al sistema provoca la difusión del disolvente a la fase externa, formándose así las nanopartículas. Dependiendo del punto de ebullición del disolvente, éste puede eliminarse por destilación o por filtración de flujo transversal. El procedimiento está ilustrado en la Figura 2.5, y al igual que en la mayoría de las técnicas anteriores, este método es eficaz para la encapsulación de fármacos lipófilos.

El mecanismo de formación de las nanopartículas ha sido descrito bajo diferentes condiciones de preparación. Se ha comprobado que cada gotícula de la

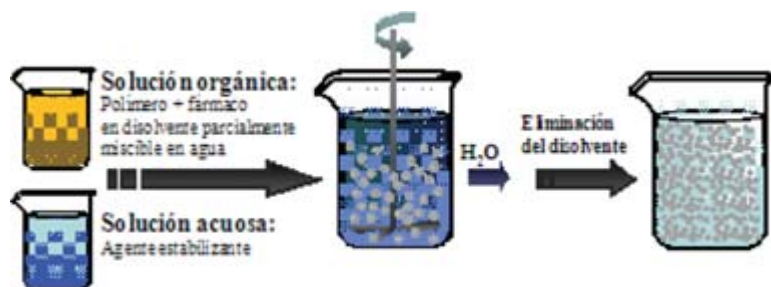


FIGURA 2.5. Representación esquemática del método de difusión del disolvente.

emulsión produce varias nanopartículas y que éstas se forman por distintos fenómenos que ocurren en la interfase durante la difusión del disolvente. Sin embargo, a diferencia de otros métodos, la formación de las nanopartículas no puede ser completamente explicada por las turbulencias producidas en la interfase. Por lo tanto, se ha sugerido que las nanopartículas se forman por la inestabilidad fisicoquímica que produce el transporte del disolvente, de manera similar al mecanismo utilizado para explicar los procesos de emulsificación espontánea (80). La difusión del disolvente desde los gotículas transporta consigo moléculas a la fase acuosa, formando regiones localizadas sobresaturadas, en las cuales se originan nuevos glóbulos o agregados de polímero (no totalmente desolvatados). La estabilización de estas «nanopartículas embrionarias» por la presencia de un agente estabilizante es crucial para evitar fenómenos de coalescencia y formación de aglomerados.

Los disolventes más utilizados para la formación de nanopartículas mediante esta técnica son el alcohol bencílico, el carbonato de propileno y el acetato de etilo. Con respecto al agente estabilizante, los más empleados son el dodecil sulfato sódico (SDS), el PVA y el bromuro de didodecilmetilamonio (DMAB) (77).

Flúidos supercríticos

Alguna de las técnicas explicadas previamente son complejas, y los productos obtenidos poseen un contenido residual de disolvente orgánico, una baja encapsulación, presentan degradación del principio activo o desnaturalización, una liberación de fármaco inadecuada, o propiedades físicas y morfológicas inapropiadas (97). Las técnicas basadas en fluidos supercríticos pueden ser una herramienta interesante para preparar productos nanoparticulados. En aplicaciones farmacéuticas, el fluido supercrítico más empleado es el CO₂, por su baja toxicidad. Moléculas como indometacina o ketoprofeno se han procesado recientemente en nanopartículas de poliésteres utilizando esta técnica (98-100).

En esta técnica, el fármaco y el polímero se solubilizan en un fluido supercrítico, y la solución se expande a través de una boquilla (Figura 2.6). El fluido supercrítico se evapora durante el proceso de generación del aerosol, y las partículas de soluto finalmente precipitan y se recogen. Las principales ventajas que ofrece esta técnica son la reducción en el uso de disolventes orgánicos y la posibilidad de formar las nanopartículas sin recurrir a elevadas temperaturas. Sin embargo, este novedoso proceso requiere una elevada inversión inicial para la obtención del equipamiento necesario y operar a elevadas presiones usando sistemas de alta presión. Además, los flúidos supercríticos comprimidos demandan una se-

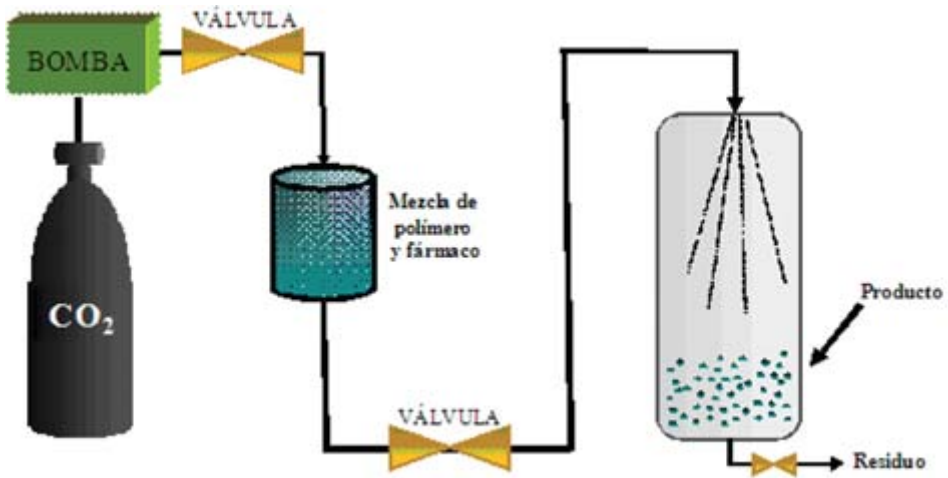


FIGURA 2.6. Representación esquemática del método de fluidos supercríticos.

rie de medidas de reciclado para reducir costes energéticos. Por último, es muy complicado disolver sustancias muy polares en CO_2 supercrítico. No obstante, el uso de cosolventes y/o tensioactivos permite disolver especies polares e iónicas.

CARACTERIZACIÓN

La importancia de las técnicas de caracterización de nanopartículas se justifica por la necesidad de adecuar la formulación a una aplicación terapéutica específica. El tamaño y la distribución granulométrica, la morfología, las propiedades de superficie, la eficiencia de encapsulación, el contenido en principio activo y el perfil de liberación del fármaco encapsulado son los principales parámetros que deben ser caracterizados una vez obtenidas las nanopartículas.

Tamaño y morfología

El tamaño puede ser determinado por diferentes técnicas, de acuerdo con el diámetro aproximado de las nanopartículas (Tabla 2.3). La microscopía óptica convencional no es adecuada para la caracterización de nanopartículas porque su resolución está limitada a $1 \mu\text{m}$. Por lo tanto, el tamaño de los sistemas nanoparticulados debe ser evaluado mediante microscopía electrónica o difracción de láser (*light scattering*).

En particular, la microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy-SEM*), además del tamaño, permite estudiar la morfología de las nanopartículas (102). A modo de ejemplo, en la Figura 2.7, se muestra una imagen de nanopartículas de PLGA obtenida por SEM. En esta técnica, la muestra es recubierta (con oro o platino) y utilizada como conductor eléctrico. Los electrones emitidos de la muestra nanoparticulada bajo un vacío elevado son detectados y se forma la imagen. Sin embargo, las propiedades de la muestra pueden verse modificadas debido al recubrimiento, y al alto vacío al que se ve sometida (103). El análisis morfológico llevado a cabo por SEM permite además determinar la distribución del principio activo encapsulado, lo que posibilita una evaluación más detallada de la eficiencia de encapsulación y del comportamiento del fármaco en la superficie o en el compartimento interno de las nanopartículas. Con el uso de SEM, cristales de cromolin sódico pudieron ser visualizados en la superficie de nanopartículas de PLA, lo que indica que este fármaco no ha sido completamente encapsulado en las mismas.

La microscopía electrónica de barrido ambiental (*Environmental scanning electron microscopy-ESEM*) permite la caracterización de una muestra nanoparticulada acuosa sin que sea necesario recubrirla ni utilizar vacío. La microscopía electrónica de transmisión (*Transmission electron microscopy-TEM*) es ampliamente utilizada para la caracterización de nanopartículas (105-107). La muestra puede ser teñida antes de su caracterización mediante TEM, lo que permite la obtención de información adicional sobre su morfología (108). Sin embargo, algunas muestras se deshacen o se dispersan cuando son irradiadas por la fuente de emisión de electrones del microscopio, lo que impide su visualización por TEM. Estas muestras de nanopartículas pueden ser visualizadas mediante TEM tras criofractura, una técnica que consiste en la congelación rápida de la muestra seguida de un corte o fractura de la misma a muy baja temperatura. A continuación, se lleva a cabo el sombreado metálico de la superficie de corte de la muestra y la observación de una réplica de la población muestral con un microscopio electrónico de transmisión. La criofractura asociada a TEM permite una observación del interior de las nanopartículas, así como de la visualización de la estructura interna de las mismas. Sin embargo, es un método muy laborioso, y por tanto, no es adecuado para el análisis de rutina (109). El uso de TEM tras criofractura proporciona mucha información acerca de la estructura interna de nanocápsulas, sobre todo de la cubierta polimérica y de la estructura interna, permitiendo una estimación del grosor de la pared de dicha cavidad (108). Por otro lado, Chávez y col. (110) estudiaron la estructura capsular de nanopartículas de un tamaño inferior a 500 nm por SEM sin tener que recurrir a la criofractura. La microscopía de fuerza atómica (*Atomic force microscopy-AFM*) es otra de las técnicas recomendadas para la evaluación de la morfología de nanopartículas y que ha sido muy utilizada en la caracterización dichos sistemas (111, 112).

El AFM permite rastrear la muestra nanoparticulada, registrando continuamente su topografía mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica.

TABLA 2.3. *Diferentes técnicas empleadas en el análisis del tamaño de partículas.*

<i>Técnica</i>	<i>Fundamento</i>	<i>Intervalo de análisis</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Limitaciones</i>
SEM (103) (102) (113)	Microscopía electrónica (barrido electrónico).	50 nm — 100 μ m	Apariencia tridimensional y morfología de la muestra.	Delicada preparación de la muestra y su influencia en el resultado. Necesita alto vacío.
TEM (106) (108) (109)	Microscopía electrónica transmisión (electrónica).	50 nm — 100 μ m	Mayor capacidad de aumento y mayor resolución que la SEM	Delicada preparación de la muestra y su influencia en el resultado. Apariencia bidimensional. Necesita alto vacío.
ESEM (102) (114)	Microscopía electrónica.	50 nm — 100 μ m	No necesidad de recubrimiento conductor. Permite trabajar en modo de bajo vacío Elevada resolución y gran profundidad de campo.	Complejidad de operación.
AFM (34) (111) (115)	Microscopía electrónica detecta (fuerzas a nivel atómico).	10 nm — 1 μ m		Imposibilidad de efectuar barridos muy grandes de la superficie.
Contador Coulter (117)	Señal eléctrica relacionada con el diámetro al pasar la partícula a través de un orificio.	100 nm — 1000 μ m	Facilidad de operación.	Estrecho rango en escala nanométrica Ajustes y cambio de componentes del aparato para efectuar el análisis a lo largo de un amplio intervalo de diámetros. No proporciona información de la morfología de la muestra. Dispersión de la muestra en un medio electrolítico.

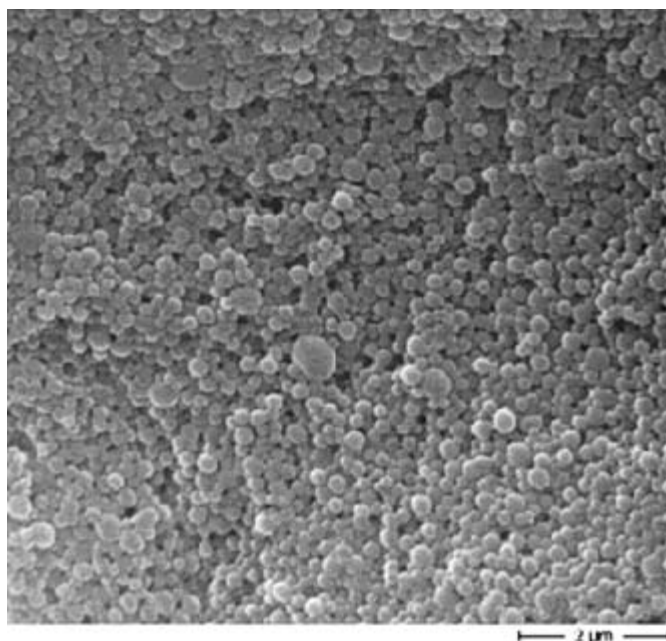


FIGURA 2.7. *Morfología de nanopartículas de PLGA obtenida por SEM.*

La espectroscopía de correlación fotónica (*Photon Correlation Spectroscopy-PCS*), técnica basada en la difracción de láser, es ampliamente utilizada en la determinación del tamaño de nanopartículas (115). Comparada con las técnicas basadas en microscopía electrónica, la PCS es una técnica rápida, precisa y que puede ser utilizada en una escala nanométrica de amplio rango. Sin embargo, presenta la desventaja de que si la muestra es polidispersa, esta técnica puede dar lugar a resultados inexactos (102). Por lo tanto, en este caso será necesario evaluar la validez de la información proporcionada por la PCS y el resultado deberá ser confirmado por SEM o por AFM. En definitiva, se deberían combinar distintas técnicas para la determinación del tamaño de las nanopartículas con el fin de obtener una información más completa (113).

Carga superficial

El potencial zeta proporciona información sobre la carga superficial de las nanopartículas, que condiciona las interacciones de las mismas con membranas celulares. El potencial zeta puede determinarse mediante anemometría láser

Doppler o por técnicas electroforéticas empleando la ecuación de Smoluchowski (118). El potencial zeta describe el comportamiento de una dispersión coloidal estabilizada eléctricamente. Valores alrededor de ± 30 mV son típicos de sistemas coloidales estables. La formación de agregados suele ocurrir cuando las fuerzas de van der Waals son dominantes, lo que resulta en una reducción de los valores del potencial zeta y la pérdida de estabilidad del sistema. El potencial zeta también depende de las condiciones del medio de dispersión, sobre todo de la concentración de electrolitos y del pH (119). Los valores del potencial zeta de nanopartículas de PLA aumentaron 30 mV cuando la concentración de NaCl fue incrementada de 0,02 a 0,1 mol/l. Cuando el pH del medio se incrementó desde un valor de 3 hasta un valor de 6, el potencial zeta de las mismas nanopartículas disminuyó 50 mV (120).

Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (%) es la relación entre la cantidad encapsulada del fármaco y la cantidad total del fármaco añadido en la preparación. El contenido en principio activo revela la cantidad real del fármaco encapsulado por unidad de masa del polímero o de la mezcla polimérica empleada en la formulación. Los procedimientos para la determinación de la eficiencia de encapsulación y del contenido en principio activo dependerán del polímero utilizado y del fármaco encapsulado. En general, el contenido en principio activo se determina tras la disolución de las nanopartículas en un disolvente apropiado seguido de la ultracentrifugación o ultrafiltración de las mismas. El fármaco se cuantifica empleando distintos métodos dependiendo de la naturaleza del principio activo (espectrofotometría-UV, HPLC, ELISA, etc.) (105, 121).

Liberación *in vitro*

La liberación del fármaco a partir de un sistema polimérico nanoparticulado depende de diversos factores: 1) desorción del fármaco de la superficie de las nanopartículas; 2) difusión del fármaco a través de la matriz polimérica de las nanoesferas; 3) difusión a través de la pared polimérica de las nanocápsulas; 4) erosión de la matriz polimérica; y 5) combinación de los procesos de difusión y erosión (69, 122). Las propiedades de liberación y los mecanismos implicados están basados en el coeficiente de difusión del fármaco y en la velocidad de biodegradación del polímero (123). La difusión en bolsas de diálisis y la se-

paración basada en ultracentrifugación o filtración a presión reducida han sido utilizadas para la determinación del perfil de liberación de fármacos a partir de nanopartículas (124, 125). Las nanocápsulas y las nanoesferas presentan distintos perfiles de liberación debido a la naturaleza del compartimento donde el fármaco está encapsulado (vesicular o matricial). Las nanoesferas encapsulan el principio activo en el interior de la matriz polimérica, lo que produce una distribución uniforme del fármaco, por lo que la liberación desde dicha matriz ocurre mediante la combinación de los procesos de difusión y erosión. Si la difusión ocurre más rápidamente que la degradación de la nanoesfera, el proceso de liberación del fármaco es difusión-dependiente. En caso contrario, la degradación es altamente influyente en el perfil de la liberación (81). En primer lugar, se produce la liberación rápida del fármaco adsorbido en la superficie de la nanopartícula (efecto *burst*) seguido de la liberación más lenta del fármaco atrapado en el interior de las mismas. En general, los sistemas matriciales presentan una cinética de liberación de primer orden (126). En las nanocápsulas, en cambio, el fármaco contenido en el núcleo debe difundir a través de la pared polimérica. La morfología vesicular de este tipo de nanopartículas es responsable de una cinética de liberación de orden cero (127). En general, los estudios de liberación de fármacos a partir de nanopartículas son complicados debido al tamaño nanométrico de dichos sistemas, lo que dificulta la separación de las nanopartículas del medio de liberación (102, 108). La concentración del fármaco en dicho medio se determina a lo largo del tiempo y utilizando el método más adecuado en cada caso y que dependerá de la molécula encapsulada (108).

Análisis complementario

Otras técnicas que se utilizan para la caracterización de los sistemas nanoparticulados son FTIR (128), NMR (129), DSC (62, 130, 131) o XPS (102, 131) (Tabla 2.4). La calorimetría diferencial de barrido (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) puede ser utilizada para evaluar el comportamiento térmico de los componentes de una formulación nanoparticulada, sobre todo modificaciones en algunas propiedades del polímero empleado en la formulación como su temperatura de transición vítrea (T_g), punto de fusión o cambios polimórficos (102, 112). Esta técnica proporciona datos cuantitativos precisos de temperaturas y flujos de calor asociados con las transiciones de fases de la materia como cristalización, fusión y evaporación, o con reacciones químicas como hidrólisis y oxidación (132). Mediante DSC, Hevönen y col. (133) observaron un aumento de la T_g del PLA causado por la presencia de beclometasona encapsulada en nanopartículas preparadas con este poliéster. Utilizando esta técnica se puede evaluar

la compatibilidad del principio activo con el polímero empleado en la formulación, mediante la determinación de la solubilidad del fármaco en el mismo. Los resultados facilitados por DSC y su interpretación pueden ser corroborados por el análisis de la forma (cristalina o amorfa) y del grado de cristalinidad del polímero y del fármaco encapsulado mediante técnicas de difracción de rayos X (*X ray Diffractometry, XRD*) (134). Con respecto al área de superficie de las nanopartículas, este parámetro puede ser determinado por la técnica de Brunauer, Emmett y Teller (BET) mediante adsorción gaseosa de nitrógeno (112).

TABLA 2.4. *Diferentes técnicas empleadas en la caracterización de sistemas nanoparticulados.*

<i>Parámetro</i>	<i>Técnica</i>
Tamaño de partícula	SEM, TEM, ESEM, AFM, PCS
Cristalinidad	XRD, DSC
Carga superficial	Electroforesis, Anemometría láser doppler
Área de superficie	BET
Análisis elemental	Espectroscopia de Fotoelectrones generados por Rayos X (XPS), Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (H-NMR), Espectrofotometría Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)

APLICACIONES

Diagnóstico mediante imagen

En las últimas décadas, técnicas de imagen tales como las basadas en imágenes ópticas, imágenes por resonancia magnética (MRI), imágenes nucleares y los ultrasonidos han sido utilizadas con éxito en diversas aplicaciones médicas. En la actualidad existe un creciente interés en diseñar nuevos tipos de agentes de contraste exógenos que permitan un diagnóstico sensible y satisfactorio de patologías específicas. El mayor inconveniente es que la mayoría de las pruebas de imagen que actualmente se emplean en clínica utilizan compuestos de bajo peso molecular que, a pesar de ofrecer resultados prometedores, tienden a ser inestables, poco específicos, tóxicos y rápidamente eliminados (13). Por ello, se están realizando numerosos esfuerzos para conseguir que estos compuestos sean biocompatibles (135). El desarrollo de agentes de contraste na-

noparticulados está contribuyendo en gran medida al campo del diagnóstico y de la imagen a nivel molecular, ya que estos sistemas proporcionan una mayor estabilidad del agente, toxicidad reducida y semivida más larga (136, 137). Además, se está avanzando en el desarrollo de nanopartículas multifuncionales que contienen tanto agentes de contraste como fármacos y en el marcaje de las mismas con ligandos específicos para conseguir agentes de contraste dirigidos. De esta manera, es posible la liberación localizada del agente terapéutico a la vez que se monitoriza su efectividad. Esta combinación de diagnóstico más terapia, también llamada teragnóstico, posibilitará una terapia individualizada para cada paciente (138).

De entre los diversos materiales que podrían emplearse para este fin, los poliésteres han despertado un gran interés debido sobre todo a su ya mencionada biocompatibilidad. Cabe destacar que a pesar de su amplia utilización en los sistemas de liberación controlada de fármacos (8), hasta el momento existen pocos estudios acerca del uso de nanopartículas de poliésteres como vehículos de agentes de contraste. A continuación, se menciona alguna de las aplicaciones de este tipo de partículas en diversas modalidades de imagen.

Imágenes por resonancia magnética

La MRI ha evolucionado como una de las técnicas más importantes en la radiología clínica. A la hora de obtener este tipo de imágenes, la intensidad de la señal en los tejidos puede manipularse mediante la administración de agentes de contraste. Entre ellos los más utilizados y estudiados son los quelatos de gadolinio y los materiales superparamagnéticos de óxidos de hierro (139).

En cuanto a los primeros, uno de los quelatos más importantes es el gadolinio-ácido dietilenotriamino pentaacético (Gd-DTPA), un agente de contraste positivo aprobado por la FDA. El mayor inconveniente de estos quelatos es que debido a su bajo peso molecular son rápidamente eliminados del sistema circulatorio (140). La conjugación de estos compuestos con polímeros biocompatibles es una de las estrategias que se puede emplear para alterar este comportamiento (13). Así, Doiron y col. (141) desarrollaron nanopartículas de PLGA y PLA-PEG. Estas nanopartículas mostraron una alta capacidad para encapsular el quelato y una liberación sostenida a lo largo de 5 horas. El Gd-DTPA también ha sido vehiculizado en micelas nanométricas compuestas de bloques de un copolímero biodegradable, el ácido poli-L-glutámico-*b*-poliláctico (PG-*b*-PLA) (142). Este tipo de formulaciones podrían

proporcionar la base para la creación de agentes de contraste dirigidos al diagnóstico de patologías específicas. De todas formas, serán necesarios ensayos en modelos animales para determinar la farmacocinética y las propiedades de imagen de estos sistemas.

Las partículas superparamagnéticas de óxidos de hierro fueron introducidas como agentes de contraste poco después de los quelatos de gadolinio. Estas partículas presentan una mayor sensibilidad para la MRI, especialmente para la obtención de imágenes del hígado y bazo pero debido a su tamaño y a que son opsonizadas por las proteínas del plasma suelen ser rápidamente aclaradas por las células fagocíticas, principalmente por las células Kupffer del hígado (143). Para su aplicación biomédica este tipo de nanopartículas suelen recurrirse con materiales biocompatibles hidrofílicos, de manera que puedan formar dispersiones estables en medios acuosos a un pH fisiológico. Se ha descrito el desarrollo de micelas de bloques de copolímeros de PEG-*b*-PCL (144) y de nanopartículas magnéticas de PLLA (145) y PLGA (146, 147) para la encapsulación de agentes de contraste superparamagnéticos. Patel y col. (147) mostraron que tras la inyección de las nanopartículas en conejos, las imágenes de resonancia magnética del hígado obtenidas resultaron tener un contraste mucho más intenso respecto a las imágenes que fueron tomadas sin la utilizar agentes de contraste.

Por otro lado, las micelas poliméricas poseen un gran potencial para combinar la liberación de fármacos antitumorales y el diagnóstico por resonancia magnética (148). Varios grupos han descrito la preparación de micelas de PEG y poliésteres, con diferentes tipos de ligandos, que contienen en su interior doxorubicina y nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (149-151). En estos trabajos las micelas presentaron una gran afinidad por las células tumorales y una alta sensibilidad para ofrecer imágenes mediante resonancia magnética.

Imagen óptica

En la última década una de las mayores novedades para la obtención de imágenes ópticas ha sido el desarrollo de los nanocristales, también denominados *quantum dots* (QD) (152, 153). Los QD son agentes de contraste inorgánicos fluorescentes que absorben la luz en un amplio rango de longitudes de onda, pero emiten una luz casi monocromática en función de su tamaño y composición. La mayoría de estos materiales contienen al menos un componente metálico tóxico en su núcleo, habitualmente cadmio, lo cual limita su uso clínico. Su solubilidad es otro factor a tener en cuenta, ya que general-

mente se preparan en disolventes orgánicos no polares. Es por ello que estas estructuras deben ser recubiertas con materiales biodegradables y biocompatibles (13, 138). Estos QD se han vehiculizado en nanopartículas poliméricas que llevan folatos conjugados en su superficie (154). Algunos tipos de células cancerosas sobreexpresan receptores para el ácido fólico, por lo que este ácido es un ligando atractivo para dirigir partículas hacia estas células y disminuir los efectos adversos de los QD en las células normales. Los ensayos celulares mostraron que los QD vehiculizados en este tipo de nanopartículas se incorporan en mayor medida en células tumorales de cáncer de mama comparando con su forma libre. Este tipo de formulación podría ofrecer una nueva estrategia para obtener imágenes específicas y sensibles para el diagnóstico del cáncer en sus etapas iniciales.

Técnicas de imagen nuclear

Las técnicas de imagen nuclear ofrecen una sensibilidad muy alta, pero al igual que ocurre en el resto de modalidades, los trazadores que se utilizan tienen una semivida corta, limitando a veces su aplicación. Los polímeros juegan un papel importante a la hora de solucionar este inconveniente, ya que pueden prolongar el tiempo de circulación de los marcadores y pueden ser modificados en función de su aplicación (155).

Un ejemplo de la contribución de los poliésteres en la mejora de esta técnica de imagen son las micelas portadoras de radioisótopos (156). En este trabajo se describe el desarrollo de micelas del copolímero PEO-PCL transportadoras del radioisótopo I^{125} , para obtener imágenes de huesos y médula ósea. Además, para evitar la rápida liberación del isótopo al torrente sanguíneo o la pérdida de radioactividad, se conjugaron químicamente los isótopos a ligandos específicos que estaban unidos a la superficie del copolímero. Los ensayos de biodistribución que se llevaron a cabo en ratones mostraron una retención del 20 % de la actividad original del I^{125} en los huesos una hora después de la administración (156).

Imágenes por ultrasonidos

La imagen por ultrasonidos es una de las técnicas más empleadas ya que es relativamente barata y no requiere tanta infraestructura como en las descritas anteriormente (157). La mayoría de los agentes de contraste de ultrasonido co-

merciales consisten en microburbujas de gas (generalmente perfluorocarbonos) encapsuladas para su administración intravenosa (158). Estos agentes permiten la visualización de la microvascularización pero no son capaces de ofrecer imágenes de capilares muy pequeños ni de estructuras que se encuentran fuera de los vasos sanguíneos. Además, son bastante inestables por lo que sólo se pueden visualizar durante un corto periodo de tiempo (159). Una de las estrategias para obtener agentes de contraste más estables es la encapsulación de perfluorocarbonos líquidos en partículas poliméricas. Mediante una modificación del método de evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión se han podido desarrollar nanopartículas de PLGA para la encapsulación de perfluorocarbonos (14).

Otra ventaja que aportan las nanopartículas es que pueden circular por capilares y atravesar los vasos sanguíneos permitiendo así visualizar estructuras que se encuentran fuera de los mismos. Un uso potencial de estos agentes de contraste es la localización específica de células cancerosas. Se ha hecho especial hincapié en el desarrollo de nanopartículas lo suficientemente pequeñas para atravesar los vasos que alimentan los tumores y que puedan ser unidas a sitios específicos mediante modificaciones en su superficie. La encapsulación de perfluorocarbonos en nanopartículas de PLA que contienen anticuerpos anti-Her2 unidos en su superficie permite obtener una ecogenicidad significativamente superior en las células tumorales de cáncer de mama que sobreexpresan receptores Her2 con respecto a las células control formulación que combina la obtención de imágenes por ultrasonido y quimioterapia mediante micelas que liberan el fármaco al ser expuestas a ultrasonido (160). En un estudio novedoso para el tratamiento del cáncer se ha desarrollado una formulación que combina la obtención de imágenes por ultrasonido y quimioterapia mediante micelas que liberan el fármaco al ser expuestas a ultrasonidos (161). Se detectó una remisión significativa de los tumores en ratones con cáncer de mama tratados con estas micelas de PEG-PLLA que contenían doxorubicina y perfluoropentano. Además, la ultrasonografía reveló una fuerte ecogenicidad en el centro del tumor que se mantenía durante al menos 4 horas tras la administración intravenosa de la formulación.

Agentes multimodales

Las técnicas de imágenes son muy valiosas para el diagnóstico temprano de algunas patologías, pero además resultaría muy útil disponer de agentes de contraste con múltiples propiedades para poder ser detectadas me-

diante diferentes modalidades de imagen (162). Esta combinación de diversas modalidades en un único sistema permite integrar las ventajas y compensar las deficiencias de los sistemas simples de imagen (163). Por ahora, la mayoría de nanoestructuras que se utilizan son vehículos que contienen agentes de contraste para una única modalidad de imagen, pero poco a poco se está avanzando en el diseño de nuevas nanoestructuras multimodales (que contienen múltiples tipos de agentes de contraste) para poder obtener una señal más amplificadas. Hasta el momento se han propuesto agentes bimodales tanto de PLGA (164-166) como de PCL (167), que ofrecen contraste para técnicas ópticas de imagen y de resonancia magnética. Estas partículas poseen una alta sensibilidad (característico de los métodos ópticos de detección) y el potencial de obtener imágenes reales en tres dimensiones (debido a los agentes de contraste para MRI). Se espera que estos sistemas multimodales sirvan para obtener diagnósticos en etapas preoperatorias y que sean a su vez útiles en el periodo postoperatorio, para el análisis directo de las biopsias mediante imagen óptica (168).

TRATAMIENTO

En los últimos años se han investigado y desarrollado numerosas aplicaciones de las nanopartículas de poliésteres en el campo de la biomedicina para el tratamiento de múltiples y muy diversas enfermedades que si bien todavía no han llegado al mercado, algunas de ellas pronto alcanzarán la fase de experimentación clínica, y en los próximos años se incorporarán o reemplazarán a las terapias existentes. Estos sistemas resultan atractivos para su empleo como nuevos tratamientos de enfermedades por la gran versatilidad de los compuestos a encapsular, ya que estas partículas son capaces de incorporar desde pequeñas moléculas de fármaco hasta macromoléculas (como péptidos, proteínas o genes), por la capacidad de proteger la molécula encapsulada así como de liberarla de manera controlada y con una cinética dependiente de la composición de la formulación, además de poder dirigir las partículas al tejido, célula u orgánulo intracelular adecuado, y por el hecho de ser totalmente biocompatibles y biodegradables. Además, tal y como se describe a continuación, estos sistemas mejoran la biodisponibilidad oral de muchos compuestos, son capaces de solubilizar fármacos para su administración intravascular y reducen la toxicidad asociada a determinadas moléculas. En la tabla 2.5 se indica un breve resumen de las principales aplicaciones descritas en la bibliografía para estas partículas.

Tabla 2.5. Tabla resumen de las principales aplicaciones de nanopartículas de poliésteres en biomedicina.

Enfermedades y fármacos aplicados	Polímero	Referencias
Infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias		
Leishmania		
Anfotericina B	PLGA	(169)
PCL	(170)	
Primaquina	PLA	(171)
Pentamidina	PLA	(17)
Atovacuona	PLA	(172)
Arjunglucósido I (4-epi-sericósido)	PLA	(173)
Micobacterias		
Estreptomina	PLGA	(26, 175)
Rifampicina, isoniazida y pirazinamida	PLGA	(176)
Brucella		
Gentamicina	PLGA	(22, 177)
Otros antibióticos		
Ciprofloxacino testado frente a <i>Escherichia coli</i>	PLGA	(178)
Nafcilina testado frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	PLGA	(179)
Cloranfenicol	PLGA	(180)
Rifampicina testado frente a bacterias gram positivas y negativas	PLGA	(181)
Cáncer		
5-FU	PLGA	(182)
PCL	(60)	
Paclitaxel	PLGA	(25, 39, 52, 183-186)
PCL	(60)	
Cisplatino	PLGA	(24, 187-190)
PCL	(198)	
Doxorubicina	PLGA	(191-193, 201)
PCL	(193)	
Camptotecina	PLGA	(194)
9-nitrocamptotecina	PLGA	(16)
Docetaxel	PLGA	(49, 195)
Adriamicina	PLGA	(196)
Tamoxifeno	PCL	(62, 197)
Taxol	PCL	(199)
Oridonina	PCL	(200)
Partículas dirigidas al tumor		
Inmuno-nanopartículas	PLGA	(184, 194, 202-204)

Fragmento TTC de la toxina C del tétanos	PLGA	(205)
A10 Aptámero	PLGA	(206)
Radioterapia (Rhenio (¹⁸⁶ Re, ¹⁸⁸ Re))	PLLA	(207)
Agentes fotosensibilizadores		
meso-tetrafenilpofolactol	PLGA	(208)
Zinc (II) ftalocianina	PLGA	(209)
Restenosis		
Agente antiproliferativo U-86983	PLGA	(211)
Lisinopril	PLGA	(212)
Paclitaxel	PLGA	(213)
Dexametasona y rapamicina	PLGA	(94)
Alendronato	PLGA	(214)
Trifostina	PLGA	(215)
Terapia génica frente a restenosis		
proteína quimiotáctica de monocitos 1	PLGA	(216)
receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas	PLGA	(217)
Vacunas		
Hepatitis B	PLGA	(23, 220, 221, 223, 224)
Difteria	PLGA	(225)
<i>Helicobacter pilori</i>	PLGA	(20)
Rotavirus	PLGA	(226)
Tétanos	PLGA	(10)
Dirigir el antígeno a las células presentadoras de antígeno	PLGA	(10, 227-229)
Nuevos compuestos adyuvantes en vacunación (CpG oligodeoxinucleotido)	PLGA	(230)
Vacuna antitumoral	PLGA	(231)
Vacunas de DNA	PLGA	(238, 252-254)
Terapia génica		
Inducir la expresión de genes mediante plásmidos de DNA	PLGA	(18, 19, 237-241)
Inhibir la expresión de determinados genes		
Mediante oligonucleótidos antisentido	PLGA	(216, 217, 242, 243)
Mediante RNA de interferencia (siRNA)	PLGA	(244-246)
Terapia combinada; (Liberación fármaco (paclitaxel) y (siRNA)	PLC/PbAE	(247)
Administración de péptidos y proteínas		
Insulina	PLGA	(15, 21, 79, 258, 260, 261)
Ciclosporina A	PLGA	(259)
Calcitonina	PLGA	(263)
Interferón- α	PLGA	(264)
Anticuerpo monoclonal 3D8 scFv	PLGA	(265)
Superóxido dismutasa	PLGA	(266)
L-asparraginasas, catalasa, glucosa oxidasa	PHBV	(47)

Tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias

Una de las ventajas debidas al tamaño de las nanopartículas, es su captación por parte del sistema fagocítico mononuclear. Así, se ha aprovechado esta característica para su empleo como vector de fármacos dirigidos a estas células. En el caso de *Leishmania*, un parásito intracelular obligado, se han encapsulado diversos fármacos como la anfotericina B en nanopartículas de PLGA (169) o PCL (170) o la primaquina (171), la pentamidina (17) y la atovacuna (172) en nanopartículas de PLA para su liberación a nivel intracelular en macrófagos. Además, la administración subcutánea de partículas de PLA con el arjunglucósido I (4-epi-sericósido) (173) disminuyó en un 75% la carga de parásitos en el bazo en un modelo in vivo de hamster, con respecto al 38% de fármaco libre. La administración de partículas de PLA vacías, disminuyó en un 25% la carga de parásito, probablemente debido al propio efecto adyuvante del polímero. Asimismo, la incorporación del fármaco en las partículas, redujo el efecto hepatotóxico y nefrotóxico asociado al fármaco (173).

Se ha descrito además el uso de nanopartículas de PLGA para la administración en infecciones bacterianas intracelulares como micobacterias (174), para la cual se ha testado la administración oral del antibiótico estreptomycin (26, 175) así como nanopartículas conteniendo tres fármacos eficaces contra esta bacteria (la rifampicina, la isoniazida y la pirazinamida) y administradas por vía pulmonar (176). En este último caso, tras la administración de las nanopartículas se mantuvieron niveles terapéuticos de fármaco durante 6-8 días en plasma, y hasta 11 días en los pulmones. La encapsulación en nanopartículas de PLGA permitió prolongar significativamente la semivida de eliminación de estos compuestos comparada con su administración oral, y ninguna micobacteria pudo ser detectada en los pulmones tras 5 dosis de tratamiento. Otro caso de infección bacteriana intracelular para la que se ha estudiado el uso de nanopartículas de PLGA con getamicina es la Brucelosis (22, 177). Otros antibióticos como el ciprofloxacino (178), la nafcilina (179), el cloranfenicol (180), y la rifampicina (181), han sido también encapsulados en este tipo de sistemas.

Cáncer

Un campo de investigación de creciente interés es la aplicación de estas nanopartículas en la terapia frente al cáncer. El empleo de nanopartículas de poliésteres se fundamenta en su capacidad de disminuir la toxicidad sistémica intrínseca de los agentes quimioterápicos, hecho que limita en gran parte la dosis

administrada a los pacientes, así como la mejora de la eficacia de los tratamientos. Las nanopartículas son dirigidas al foco del tumor, desde el que van liberando de manera controlada el fármaco antineoplásico, prolongando la semivida del fármaco y ejerciendo una acción local.

Existen múltiples ejemplos de estos fármacos antineoplásicos encapsulados en partículas de PLGA [5-FU (182), paclitaxel (25, 39, 52 183-186), cisplatino (24, 187-190), doxorubicina (191-193), camptotecina (194), 9-nitrocantotecina (16), docetaxel (49, 195), adriamicina (196)], o en nanopartículas de PCL como el tamoxifeno (62, 197), cisplatino (198), taxol (199), doxorubicina (193), oridonina (200) o 5-FU y paclitaxel (60), etc.

Las nanopartículas pueden ser administradas por diferentes vías; por vía oral se obtiene un aumento significativo de la biodisponibilidad de fármacos antineoplásicos que presentan una baja absorción y/o una elevada toxicidad cuando se administran de forma libre. Administrando el fármaco en nanopartículas se consiguen espaciar las administraciones del quimioterápico, reduciendo considerablemente los efectos secundarios asociados a nivel gastrointestinal. Administradas por vía intravenosa las nanopartículas han sido utilizadas para el tratamiento de tumores cerebrales. Nanopartículas de PLGA cubiertas de polisorbato 80 o poloxámero 188 fueron capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y liberar doxorubicina aumentando significativamente la esperanza de vida en ratas con glioblastoma (201) y reduciendo considerablemente la cardiotoxicidad y la toxicidad testicular asociada a la administración del fármaco libre. El transporte del fármaco a través de la barrera hematoencefálica por parte de las nanopartículas parece ser debido a una interacción mediada por receptor en las células endoteliales del capilar cerebral, facilitada por ciertas apolipoproteínas del plasma adsorbidas a las nanopartículas a lo largo de su transporte por la sangre (201).

Además, dada la elevada toxicidad de los fármacos antineoplásicos, se han realizado múltiples aproximaciones para dirigir estas partículas de manera específica al tumor. Así, se han incorporado a la formulación anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos dirigidos frente a epítomos propios sobreexpresados o expresados únicamente por el tumor (inmuno-nanopartículas) (184, 194, 202-204), el fragmento TTC de la toxina C del tétanos para dirigirlas al sistema nervioso central (205), u otros ligandos como el aptámero A10 (206) molécula que se une a un antígeno específico presente en la membrana de células cancerígenas de próstata. Esta acción dirigida aumenta la biodisponibilidad del fármaco en el lugar de acción, reduciendo a la vez los efectos secundarios del tratamiento.

Asimismo, el empleo de nanopartículas en medicina nuclear se ha extendido al tratamiento del cáncer en el campo de la radioterapia. Se ha descrito recientemente la encapsulación en nanopartículas de poliésteres de radioisótopos como el Rhenio (^{186}Re , ^{188}Re) (207). La implantación mediante inyección intratumoral de estas partículas, permite que la radiación quede localizada y restringida a la zona de la masa tumoral irradiada por las propias nanopartículas.

Otro campo en el que se está investigando a fin de disminuir los efectos tóxicos de la terapia antitumoral, es el empleo de agentes fotosensibilizadores, moléculas capaces de generar especies reactivas del oxígeno citotóxicas, únicamente cuando son excitadas a una longitud de onda determinada. Nanopartículas de PLGA se formularon incorporando diversos fotosensibilizadores como el meso-tetrafenilpofolactol (208) o el Zinc (II) ftalocianina (209). En algunos casos, las partículas no son fototóxicas, y sólo tras la internalización de la partícula en la célula diana el fotosensibilizador es liberado y resulta entonces sensible a la acción de la excitación a longitud de onda adecuada.

Restenosis

La restenosis es una enfermedad en la que se produce el estrechamiento y reobstrucción de una arteria, que experimentan algunos pacientes tras haberse sometido a un procedimiento de angioplastia. La restenosis se produce cuando la arteria se vuelve a estrechar debido a un crecimiento del tejido cicatricial en la pared interior de la arteria en el lugar de la cirugía como resultado del trauma mecánico originado por la intervención quirúrgica. Se han descrito diversos compuestos para el tratamiento de esta enfermedad, pero ninguno de ellos ha conseguido su validación clínica, ya que la administración sistémica de los mismos resulta en una insuficiente concentración en el lugar del daño arterial (210). Por ello, la administración controlada y sostenida de estos compuestos liberados desde nanopartículas implantadas en el lugar de la intervención quirúrgica se ha postulado como una alternativa con grandes posibilidades de éxito para el tratamiento de esta enfermedad. El tamaño de las nanopartículas permite su penetración en la pared arterial, desde donde se puede liberar el fármaco, alcanzado así un mayor efecto terapéutico. Diversas moléculas han sido encapsuladas en nanopartículas de PLGA para ser empleadas en el tratamiento de la restenosis, tales como el agente antiproliferativo U-86983, (211), lisinopril (212), paclitaxel (213), dexametasona y rapamicina (94), alendronato (214) o la trifostina (215). También se han descrito trabajos de liberación intravascular, para la posterior internalización intracelular de nanopartículas encapsulando plásmi-

dos u oligodeoxinucleótidos antisentido, con el fin de inhibir la expresión de genes implicados en la enfermedad, como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (216) y el receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFbetaR-AS) (217). Además, la modificación de la superficie de la nanopartícula con la incorporación de compuestos como la heparina o el bromuro de didodecilmetilamonio (DMAB) permite la localización de las partículas en la pared arterial (211, 218).

Vacunación

En los últimos años se ha estudiado la encapsulación o adsorción de antígenos en la superficie de nanopartículas biodegradables como una alternativa al adyuvante tradicional alum con el objetivo de desarrollar mejores vacunas y reducir tanto la frecuencia como el número de dosis requeridas para la inmunización. Además se ha estudiado el empleo de nuevas rutas y vías de administración de vacunas que resulten más seguras para el paciente. Las nanopartículas que contienen antígeno encapsulado pueden ser empleadas como un adyuvante eficaz, dado que pueden actuar como reservorio y liberar el antígeno de manera sostenida, así como protegerlo de la degradación y dirigirlo a las mucosas en el caso de la inmunización oral, nasal o pulmonar, o a las células presentadoras de antígeno en el caso de las inoculaciones parenterales. Asimismo, las nanopartículas pueden incorporar otros adyuvantes en la formulación, que puedan aumentar o modular la respuesta inmune. La posibilidad de dirigir las nanopartículas a las mucosas (ya sea por la vía oral, nasal o pulmonar), mimetiza, al menos en parte, la vía natural de entrada al huésped de la mayoría de virus y bacterias, aumentando la eficacia.

Se han llevado a cabo diversos estudios para desarrollar vacunas frente a diferentes enfermedades, empleando nanopartículas de PLGA. Es el caso de la hepatitis B, una enfermedad que produce la inflamación del hígado y que afecta casi al 5% de la población mundial (8). Entre un 5-10% de las infecciones agudas de esta enfermedad en adultos y hasta el 90% en el caso de niños se convierten en crónicas (219) debido a la falta de un tratamiento específico. Estos datos muestran cómo la vacunación se convierte en el único método para prevenir la expansión del virus. Además, el poder dirigir el tipo de respuesta inmune a conseguir es relevante en este caso, ya que una vez establecida la cronicidad de la enfermedad, la respuesta inmune celular resulta curativa para esta enfermedad, pero la respuesta humoral puede resultar perjudicial. Así, nanopartículas de PLGA encapsulando el antígeno viral HBcAg se administraron a ra-

tones con o sin el inmunomodulador monofosfolípido A que favorece la respuesta Th1, obteniéndose mejores resultados de producción de interferón- γ con el inmunomodulador que en ausencia del mismo (220). La capacidad de dirigir una respuesta inmune de tipo Th1 por parte de las nanopartículas de PLGA encapsulando el mismo antígeno HBcAg se demostró nuevamente en los trabajos de Lutsiak y col. (23). Estudios recientes demostraron la presencia de anticuerpos anti-HB a tiempos significativamente más tempranos en ratones inmunizados con el antígeno HbsAg encapsulado en nanopartículas de PLGA que administrado de forma libre (221). Otros trabajos de desarrollo de micro y nanopartículas de PLGA para su empleo como vacunas frente a la hepatitis B han sido recogidos por Bharali y col. (222). También se han desarrollado vacunas de nanopartículas de PLGA para esta enfermedad encapsulando el antígeno HBcAg para su administración oral, dirigiendo de manera específica las nanopartículas a las células M en las placas de Peyer, mediante el empleo de la lectina *Ulex europaeus* I en un caso (223), o la lectina proveniente de la *Arachis hipogea* en otro (224), obteniéndose mejores resultados en el caso de las partículas dirigidas a las células M que las no dirigidas, y un título de anticuerpos anti-HBsAg en suero por parte de las nanopartículas dirigidas y administradas oralmente, comparable al obtenido al inyectar el antígeno por vía intramuscular, junto con el adyuvante alum.

Se han descrito además estudios de vacunas empleando nanopartículas de PLGA, PCL y una mezcla de ambos polímeros, para la inmunización por vía intranasal e intramuscular frente a difteria (225), mediante nanopartículas de PLGA para la inmunización por vía oral frente a *Helicobacter pylori* (20) y rotavirus (226), y para el tétanos mediante inmunización tanto por vía oral como nasal (10).

Otros trabajos tienen por objeto conseguir un modelo de vacuna que permita dirigir el antígeno a las células presentadoras de antígeno (células dendríticas) (227-229), y otra línea de investigación es el desarrollo de nuevos compuestos que puedan ser coencapsulados en las nanopartículas de PLGA para ser empleados como adyuvantes en la formulación a fin de modular la respuesta inmune (230).

Además de su empleo como terapia preventiva en enfermedades infecciosas, también se ha estudiado el empleo de vacunas para estimular el sistema inmune en la terapia frente al cáncer. Diversos antígenos tumorales han sido encapsulados en nanopartículas de PLGA para eliminar la tolerancia a auto-antígenos tumorales, o para potenciar al sistema inmune frente a estos antígenos tumorales (231).

Terapia génica

Las nanopartículas poliméricas de PLGA han sido empleadas para el desarrollo de vectores no virales en terapia génica. Los vectores virales presentan problemas de inmunogenicidad, además de su posible integración en el genoma celular y la limitación del material genético que son capaces de incorporar. En los últimos años se han descrito múltiples vectores no virales modificados con lípidos catiónicos, polímeros catiónicos (232-236), etc. Sin embargo, el empleo de las nanopartículas de poliésteres como vectores garantiza una mayor estabilidad, una mayor duración de la expresión génica y sobre todo una menor citotoxicidad al emplear polímeros biodegradables y biocompatibles. De hecho, hoy en día se valora la importancia de la seguridad del vector de expresión al mismo nivel que la eficiencia de expresión génica para el éxito de la terapia génica (210). Así, se han descrito trabajos tanto para inducir la expresión de genes mediante plásmidos de DNA (18, 19, 237-241), como para inhibir la expresión de determinados genes mediante oligonucleótidos antisentido (216, 217, 242, 243) o RNA de interferencia (siRNA) (244-246) liberados desde estos sistemas. Incluso se han descrito trabajos en la lucha contra el cáncer en los que se emplea una terapia combinada de liberación controlada del fármaco antineoplásico paclitaxel desde nanopartículas de PCL junto a silenciamiento de genes mediante la liberación de moléculas de siRNA desde nanopartículas de poli-beta-amino-ésteres (PbAE) a fin de obtener un mayor efecto terapéutico (247).

Se ha demostrado que el empleo de nanopartículas de PLGA posee numerosas ventajas con respecto a otros vectores no virales convencionales como la polietilénimina: no son citotóxicas e incrementan significativamente la expresión del transgén (18, 19) ya que la duración y la velocidad de liberación del material genético desde las nanopartículas puede ser modulado modificando los componentes de la formulación; la relación láctico/glicólico, el peso molecular del polímero y la composición de la formulación. Al igual que para otras aplicaciones biomédicas, la liberación intracelular sostenida en el tiempo del material genético y la posibilidad de modificar las características de la superficie de las nanopartículas recubriéndolas con ligandos u otro tipo de sustancias que dirijan las partículas a las células diana, ofrece una mejora sustancial con respecto al empleo de otros vectores. Como se ha mencionado anteriormente, la internalización intracelular de las nanopartículas depende en gran medida de las características de la superficie de las mismas, incluyendo el potencial de membrana, hidrofiliidad, etc. que también puede ser modificadas. De hecho, la carga de la superficie de las nanopartículas es la característica que les permite escapar de los endolisosomas una vez que son internalizadas en las células (248);

así, variando la carga de la superficie de la partícula se puede dirigir potencialmente al lisosoma o al citoplasma. Se ha especulado incluso con la posibilidad de incorporar señales de localización a orgánulos específicos para dirigir las nanopartículas en el interior celular, como la señal de localización nuclear en el caso de la terapia génica (210), a fin de conseguir mejorar la eficiencia de transfección. A su vez, la internalización de las nanopartículas depende de su tamaño, y se ha comprobado que esta característica puede afectar a la eficiencia de transfección de plásmidos de DNA (249). Así, partículas de tamaño inferior a 100 nm presentaron una capacidad de transfección 27 veces superior a nanopartículas de tamaño superior (250). Otro parámetro importante a tener en cuenta en la formulación es el peso molecular del polímero. Nanopartículas formuladas con un polímero de PLGA de peso molecular 143 kDa mostraron entre 50 y 100 veces mayor eficiencia de transfección génica que aquellas nanopartículas formuladas con el polímero de peso molecular de 12 kDa; las obtenidas con el de 53 kDa presentaron a su vez entre 6 y 15 veces más eficiencia de transfección que las de 12 kDa (251). Este hecho se atribuye a la mayor encapsulación de DNA en las nanopartículas. La composición del polímero puede a su vez afectar a la hidrofobicidad de las nanopartículas y por tanto puede influenciar la encapsulación y la liberación del DNA desde las mismas. Nanopartículas preparadas empleando polímeros más hidrofóbicos (PLA) mostraron una eficiencia de transfección menor que aquellas formuladas con copolímeros de ácido láctico y glicólico (251). La liberación más lenta de DNA desde la matriz polimérica más hidrofóbica puede ser responsable de los menores niveles de transfección génica.

Además de su empleo para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una alteración genética, las nanopartículas biodegradables de PLGA han sido utilizadas para la liberación de plásmidos de DNA que codifiquen para la expresión de proteínas antigénicas como una nueva estrategia de vacunación. Este sistema de vacunación con DNA presenta diversas ventajas como inducir una respuesta humoral y celular, la facilidad de producción y la mejora de la estabilidad del DNA (238, 252-254).

Administración de péptidos y proteínas

El desarrollo experimentado en los últimos años en la tecnología para la producción y purificación de proteínas terapéuticas recombinantes, así como la alta especificidad y actividad de las mismas, ha provocado un creciente interés por el empleo de éstas en el tratamiento de múltiples enfermedades. En el grupo de

proteínas potencialmente terapéuticas se incluyen entre otras, hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos, factores neurotróficos, enzimas, etc. (255-257). El desarrollo de esta tecnología, ha forzado el progreso paralelo de tecnologías para la administración de estas macromoléculas, ya que la administración libre de las mismas presenta problemas de baja biodisponibilidad por vía oral debido a su inestabilidad en el tracto gastrointestinal, a que presentan una semivida corta por la acción de las proteasas, y que muchas de ellas no son capaces de difundir a través de determinadas barreras biológicas como la barrera hematoencefálica. En los últimos años se han intensificado los esfuerzos para la encapsulación de estas proteínas y péptidos en nanopartículas de PLGA, ya que estos vectores poliméricos pueden mantener la integridad y la actividad.

Dado que las proteínas son compuestos generalmente hidrofílicos, el método más utilizado para la preparación de estas nanopartículas es la evaporación del disolvente tras la formación de una doble emulsión de tipo A/O/A.

Existen varios obstáculos para la encapsulación de proteínas en nanopartículas de PLA, PLGA, PCL, etc. Uno de los principales problemas es que los productos ácidos de la degradación del polímero, pueden interactuar con las cargas positivas de la proteína pudiendo alterar o bloquear su liberación o exponer a la proteína encapsulada a un pH ácido, pudiendo formar agregados de proteína encapsulada que afectan directamente a la actividad de la misma. Otro de los factores que pueden alterar la estabilidad de la proteína son los procesos de homogenización (por sonicación, alta presión, etc.) necesarios para la formulación de las partículas. Además, las proteínas tienden a migrar a la interfase existente entre la fase acuosa y la orgánica, hecho que puede provocar cambios conformacionales que afectan a la actividad de la proteína, y que pueden transformarla en inmunogénica (210).

Para todo ello se han empleado diferentes estabilizantes en la formulación de las nanopartículas de PLGA, a fin de mantener la integridad y actividad de las proteínas encapsuladas. Así por ejemplo, diferentes estabilizantes como el pluronic F68, trehalosa, bicarbonato sódico fueron empleados para mantener la estabilidad de la insulina, de manera que la liberación controlada de la proteína activa desde las nanopartículas disminuyó de manera prolongada los niveles de glucosa en un modelo animal de rata diabética (21, 28).

Otro de los objetivos perseguidos es la mejora de la biodisponibilidad de péptidos y proteínas administradas por la vía oral. Así por ejemplo, se han descrito trabajos de formulación de nanopartículas de PLGA para mejorar la biodisponibilidad de péptidos como la ciclosporina A (259) y de hormonas como

la insulina (15, 260 261). Otra de las vías de administración estudiadas para la administración de proteínas es la vía pulmonar (262). Así, se han diseñado nanopartículas de PLGA recubiertas de quitosano para la administración pulmonar del péptido calcitonina (263). El recubrimiento con quitosano, polisacárido biodegradable mucoadhesivo, tenía por objeto prolongar la retención de las nanopartículas en el pulmón, tal y como se demostró en un modelo de cobaya. Las partículas recubiertas presentaron un efecto farmacológico en la disminución de los niveles de calcio en sangre significativamente más prolongado que las partículas sin recubrir, y fueron eliminadas más lentamente que las nanopartículas no modificadas. Esta vía también ha sido utilizada para la administración de insulina encapsulada en nanopartículas de PLGA. Así, Kawashima y col. (79) formularon y administraron mediante el empleo de un inhalador nanopartículas de PLGA a cobayas, demostrando una reducción significativa de los niveles de glucosa en sangre, comparado con la administración de una solución de insulina.

Se ha descrito la encapsulación de la citoquina interferón- γ en nanopartículas y micropartículas de PLGA (264) consiguiéndose mantener la integridad estructural y la actividad de la proteína. En el caso de la encapsulación del anticuerpo monoclonal 3D8 scFv en nanopartículas de PLGA (265), el empleo del estabilizante manitol en la formulación permitió mantener la estabilidad y la actividad del anticuerpo. Además, la encapsulación de la enzima superóxido dismutasa en nanopartículas de PLGA, protegió del estrés oxidativo a un cultivo celular de neuronas humanas (266).

CONCLUSIONES

La variedad de polímeros, el desarrollo de nuevos derivados poliméricos y nuevas metodologías para la elaboración de nanopartículas formuladas a partir de poliésteres, han permitido que un gran número de grupos de investigación haya focalizado sus trabajos en el desarrollo de estos sistemas. De los retos pendientes queda por mejorar los rendimientos de los procesos de fabricación y sobre todo la adaptación de la fabricación de estos sistemas a escala industrial y en condiciones asépticas, ya que los poliésteres son susceptibles de degradación con la mayoría de los métodos de esterilización habitualmente empleados. Sin embargo y a pesar de ciertas limitaciones, estas nanopartículas representan sistemas prometedores para la administración de un amplio rango de moléculas activas como sustancias antitumorales, antibióticos, péptidos, proteínas, genes, etc, que serán utilizadas tanto en el tratamiento como en el diagnóstico de múltiples patologías.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Kitchell, J.P. & Wise, D.L. (1985) Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug-polymer matrix systems. *Methods Enzymol.* 112: 436-48.
- (2) Lewis, D.H. (1990) Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Biodegradable polymers as drug delivery systems (eds. M Chasin, R Langer). pp 1-41. Marcel Dekker, New York.
- (3) Wu, X.S. (1995) Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering (ed. We al.). pp 1015-1054. Marcel Dekker, New York.
- (4) Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R. & Trehan, A. (2004) Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. J. Pharm.* 278: 1-23.
- (5) Pouton, C.W. & Akhtar, S. (1996) Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 18: 133-162.
- (6) Portilla-Arias, J.A., Garcia-Alvarez, M., Galbis, J.A. & Munoz-Guerra, S. (2008) Biodegradable nanoparticles of partially methylated fungal poly(beta-L-malic acid) as a novel protein delivery carrier. *Macromolecular Bioscience.* 8: 551-559.
- (7) Pinto Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J. & Veiga, F. (2006) Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine.* 2: 8-21.
- (8) Mundargi, R.C., Babu, V.R., Rangaswamy, V., Patel, P. & Aminabhavi, T.M. (2008) Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Control Release.* 125: 193-209.
- (9) Adams, M.L., Lavasanifar, A. & Kwon, G.S. (2003) Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 92: 1343-1355.
- (10) Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Hungerer, K.D., Hundt, E. & Kissel, T. (2001) Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide): Evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice. *Pharm. Res.* 18: 352-360.
- (11) Lassalle, V. & Ferreira, M.L. (2007) PLA nano- and microparticles for drug delivery: An overview of the methods of preparation. *Macromolecular Bioscience.* 7: 767-783.
- (12) Murakami, H., Kawashima, Y., Niwa, T., Hino, T., Takeuchi, H. & Kobayashi, M. (1997) Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of poly(vinylalcohol) on the preparation and properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle. *Int. J. Pharm.* 149: 43-49.

- (13) Kim, J.-H., Park, H., Nam, H.Y., Lee, S., Kim, K. & Kwom, I.C. (2007) Polymers for bioimaging. *Prog. Polym. Sci.* 32: 1031-1053.
- (14) Pisani, E., Tsapis, N., Paris, J., Nicolas, V., Cattel, L. & Fattal, E. (2006) Polymeric Nano/Microcapsules of Liquid Perfluorocarbons for Ultrasonic Imaging: Physical Characterization. *Langmuir.* 22: 4397-4402.
- (15) Cui, F.D., Tao, A.J., Cun, D.M., Zhang, L.Q. & Shi, K. (2007) Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery. *J. Pharm. Sci.* 96: 421-7.
- (16) Derakhshandeh, K., Erfan, M. & Dadashzadeh, S. (2007) Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: factorial design, characterization and release kinetics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66: 34-41.
- (17) Durand, R., Paul, M., Rivollet, D., Fessi, H., Houin, R., Astier, A. & Deniau, M. (1997) Activity of pentamidine-loaded poly (D,L-lactide) nanoparticles against *Leishmania infantum* in a murine model. *Parasite.* 4: 331-6.
- (18) Gwak, S.J. & Kim, B.S. (2008) Poly(lactic-co-glycolic acid) nanosphere as a vehicle for gene delivery to human cord blood-derived mesenchymal stem cells: comparison with polyethylenimine. *Biotechnol. Lett.* 30: 1177-82.
- (19) Kang, S.W., Lim, H.W., Seo, S.W., Jeon, O., Lee, M. & Kim, B.S. (2008) Nanosphere-mediated delivery of vascular endothelial growth factor gene for therapeutic angiogenesis in mouse ischemic limbs. *Biomaterials.* 29: 1109-17.
- (20) Kim, S.Y., Doh, H.J., Jang, M.H., Ha, Y.J., Chung, S.I. & Park, H.J. (1999) Oral immunization with *Helicobacter pylori*-loaded poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Helicobacter.* 4: 33-9.
- (21) Kumar, P.S., Saini, T.R., Chandrasekar, D., Yellepeddi, V.K., Ramakrishna, S. & Diwan, P.V. (2007) Novel approach for delivery of insulin loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles using a combination of stabilizers. *Drug Deliv.* 14: 517-23.
- (22) Lecaroz, C., Gamazo, C. & Blanco-Prieto, M.J. (2006) Nanocarriers with gentamicin to treat intracellular pathogens. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 3296-302.
- (23) Lutsiak, M.E., Kwon, G.S. & Samuel, J. (2006) Biodegradable nanoparticle delivery of a Th2-biased peptide for induction of Th1 immune responses. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 739-47.
- (24) Mattheolabakis, G., Taoufik, E., Haralambous, S., Roberts, M.L. & Avgoustakis, K. (2008) In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*
- (25) Mo, Y. & Lim, L.Y. (2005) Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: potentiation of anticancer activity by surface conjugation with wheat germ agglutinin. *J. Control Release.* 108: 244-62.

- (26) Pandey, R. & Khuller, G.K. (2006) Nanotechnology based drug delivery system(s) for the management of tuberculosis. *Indian J. Exp. Biol.* 44: 357-66.
- (27) Lee, H., Chung, H.J. & Park, T.G. (2007) Perspectives on: local and sustained delivery of angiogenic growth factors. *J. Bioactive and Compatible Polymers.* 22: 89-114.
- (28) Jain, R., Shah, N.H., Malick, A.W. & Rhodes, C.T. (1998) Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly(Ester) Devices: Different Preparative Approaches. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 24: 703-727.
- (29) Jain, RA. (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials.* 21: 2475-2490.
- (30) Thomas, C.B. & Burg, K.J.L. (2004) Tissue Engineering Systems. In: Absorbable and Biodegradable Polymers (eds. WS Shalaby, KJL Burg). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- (31) Lunt, J. (1998) Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polymer Degradation and Stability.* 59: 145-152.
- (32) Bendix, D. (1998) Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability.* 59: 129-135.
- (33) Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P., Dellacherie, E., Alonso, M.J., Labrude, P. & Vigneron, C. (1998) Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactid acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J. Controlled Release.* 50: 31-40.
- (34) Kumar, M.N.V.R., Bakowsky, U. & Lehr, C.M. (2004) Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials.* 25: 1771-1777.
- (35) Bittner, B., Ronneberger, B., Zange, R., Volland, C., Anderson, J.M. & Kissel, T. (1998) Bovine serum albumin loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: the influence of polymer purity on particle characteristics. *J. Microencapsulation.* 15: 495-514.
- (36) Uhrich, K.E., Cannizzaro, S.M., Langer, R.S. & Shakesheff, K.M. (1999) Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews.* 99: 3181-3198.
- (37) Gu, Z.W., Ye, W. & Yang, J. (1992) Biodegradable block copolymer matrices for long acting contraceptive with constant release. *J. Controlled Release.* 22: 3-14.
- (38) Lemoine, D. & Preat, V. (1998) Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins. *J. Controlled Release.* 54: 15-27.
- (39) Fonseca, C., Simoes, S. & Gaspar, R. (2002) Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control Release.* 83: 273-286.

- (40) Dillen, K., Vandervoort, J., Van den Mooter, G., Verheyden, L. & Ludwig, A. (2004) Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharmaceutics*. 275: 171-187.
- (41) Ayalasomayajula, S.P. & Kompella, U.B. (2005) Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles sustain retinal drug levels and alleviate diabetes-induced oxidative stress in a rat model. *Eur. J. Pharmacol.* 511: 191-198.
- (42) Bergsma, J.E., de Bruijn, W.C., Rozema, F.R., Bos, R.R. & Boering, G. (1995) Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Bio-materials*. 16: 25-31.
- (43) Marchal-Heussler, L., Sirbat, D., Hoffman, M. & Maincent, P. (1993) Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsule in cartelol ophthalmic delivery. *Pharmaceutical Research*. 10: 386-390.
- (44) Calvo, P., Alonso, M.J., Vila-Jato, J.L. & Robinson, J.R. (1996) Improved ocular bioavailability of Indomethacin by novel ocular drug carriers. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 1147-1152.
- (45) Alonso, M.J., Garcia, M.L., Epsina, M., Valls, O. & Egea, M.A. (2000) Aclofenac-loaded poly-epsilon-caprolactone nanocapsules. Effects of coadjuvants on morphological properties and drug entrapment. *Bollettino Chemico Farmaceutico*. 139: 114-119.
- (46) Vanin, M., Santana, C.C., Torriani, I.L., Privelic, T. & Duek, E.A.R. (2004) Estudo da Degradação «In Vitro» de Blendas de Poli(L-Hidroxibutirato) (PHB) / Poli(L-Ácido Lático) (PLLA) na Forma de Filmes. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 14: 187-193.
- (47) Baran, E.T., Ozer, N. & Hasirci, V. (2002) Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an in vitro study. *J. Microencapsul.* 19: 363-76.
- (48) Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J. & Préat, V. (2006) Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J. Controlled Release*. 116: 1-27.
- (49) Senthilkumar, M., Mishra, P. & Jain, N.K. (2008) Long circulating PEGylated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticulate delivery of Docetaxel to solid tumors. *J. Drug Target*. 16: 424-435.
- (50) Stolnik, S., Dunn, S.E., Garnett, M.C., Davies, M.C., Coombes, A.G.A., Taylor, D.C., Irving, M.P., Purkiss, S.C., Tadros, T.F., Davis, S.S. & Illum, L. (1994) Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethilenglycol) copolymers. *Pharm. Res.* 11: 1800-1808.
- (51) Garinot, M., Fiévez, V., Pourcelle, V., Stoffelbach, F., Rieux, A., Plapied, L., Theate, I., Freichels, H., Jérôme, C., Marchand-Brynaert, J., Schneider, Y.J. & Préat,

- V. (2007) PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J. Control Release*. 120: 195-204.
- (52) Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O. & Preat, V. (2009) Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *J. Control Release*. 133: 11-7.
- (53) Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V. & Langer, R. (1994) Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, 263: 1600-1603.
- (54) Vila, A., Sanchez, A., Tobio, M., Calvo, P. & Alonso, M.J. (2002) Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Controlled Release*. 78: 15-24.
- (55) Dailey, L.A., Wittmar, M. & Kissel, T. (2005) The role of branched polyesters and their modifications in the development of modern drug delivery vehicles. *J. Control Release*. 101: 137-149.
- (56) Unger, F., Wittmar, M., Morell, F. & Kissel, T. (2008) Branched polyesters based on poly[vinyl-3-(dialkylamino) alkylcarbamate-co-vinyl acetate-co-vinyl alcohol]-graftpoly(D,L-lactide-co-glycolide): Effects of polymer structure on in vitro degradation behaviour. *Biomaterials*. 29: 2007-2014.
- (57) Oster, C.G., Wittmar, M., Bakowsky, U. & Kissel, T. (2006) DNA nano-carriers from biodegradable cationic branched polyesters are formed by a modified solvent displacement method. *J. Control Release*. 111: 371-381.
- (58) Oster, C.G., Wittmar, M., Unger, F., Barbu-Tudoran, L., Schaper, A.K. & Kissel, T. (2004) Design of amine-modified graft polyesters for the effective gene delivery using DNA loaded nanoparticles. *Pharm. Res.* 21: 927-931.
- (59) Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Klebe, G. & Kissel, T. (2002) Loading of tetanus toxoid to biodegradable nanoparticles from branched poly (sulfobutyl-poly (vinyl alcohol)-g-(lactide-coglycolide)) nanoparticles by protein adsorption: a mechanistic study. *Pharm. Res.* 19: 1105-1113.
- (60) Chen, S., Zhang, X.Z., Cheng, S.X., Zhuo, R.X. & Gu, Z.W. (2008) Functionalized amphiphilic hyperbranched polymers for targeted drug delivery. *Biomacromolecules*. 9: 2578-2585.
- (61) Cauchetier, E., Deniau, M., Fessi, H., Astier, A. & Paul, M. (2003) Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. *Int. J. Pharm.* 250: 273-281.
- (62) Chawla, J.S. & Amiji, M.M. (2002) Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *Int. J. Pharm.* 249: 127-138.
- (63) Molpeceres, J., Aberturas, M.R. & Guzman, M. (2000) Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: preparation and characterization. *J. Microencapsul.* 17: 599-614.

- (64) Packhaeuser, C.B. & Kissel, T. (2007) On the design of in situ forming biodegradable parenteral depot systems based on insulin loaded dialkylaminoalkyl-amine-poly(vinyl alcohol)-g-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *J. Control Release*. 123: 131-40.
- (65) Hans, M.L. & Lowman, A.M. (2002) Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State and Materials Science*. 6: 319-327.
- (66) Couvreur, P., Dubernet, C. & Puisieux, F. (1995) Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41: 2-13.
- (67) Vanderhoff, J.W., El-Aaser, M.S. & Ugelstad, J. (1979).
- (68) Venier-Julienne, M.C. & Benoit, J.P. (1996) Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharm. Acta Helv.* 71: 121-8.
- (69) Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. & Rudzinski, W.E. (2001) Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control Release*. 70: 1-20.
- (70) ICH guidelines for residual solvents. (1996), pp 67377-67388.
- (71) Rouzes, C., Leonard, M., Durand, A. & Dellacherie, E. (2003) Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres. *Colloid Surf.* 32: 125-135.
- (72) Mainardes, R.M., Gremiao, M.P., Brunetti, I.L., da Fonseca, L.M. & Khalil, N.M. (2009) Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. *J. Pharm. Sci.* 98: 257-67.
- (73) Wehrle, P., Magenheimer, B. & Benita, S. (1995) The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution evaluated by means of factorial design. *J. Pharm. Biopharm.* 41: 19-26.
- (74) Mainardes, R.M., Chaud, M.V., Gremiao, M.P. & Evangelista, R.C. (2006) Development of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles and evaluation of intestinal permeation by the everted gut sac model. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 3057-61.
- (75) Zhao, J., Gou, M., Dai, M., Li, X., Cao, M., Huang, M., Wen, Y., Kan, B., Qian, Z. & Wei, Y. (2008) Preparation, characterization, and in vitro cytotoxicity study of cationic PCL-Pluronic-PCL (PCFC) nanoparticles for gene delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A*.
- (76) Koosha, F., Muller, R.H. & Davis, S.S. (1989) Polyhydroxybutyrate as a drug carrier. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6: 117-30.
- (77) Astete, C.E. & Sabliov, C.M. (2006) Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 17: 247-89.

- (78) Quintanar-Guerrero, D., Allemann, E., Fessi, H. & Doelker, E. (1999) Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *Int. J. Pharm.* 188: 155-64.
- (79) Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H. & Kawashima, Y. (1999) Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int. J. Pharm.* 187: 143-52.
- (80) Galindo-Rodriguez, S., Allemann, E., Fessi, H. & Doelker, E. (2004) Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm. Res.* 21: 1428-39.
- (81) Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Kunou, N. & Kawashima, Y. (1993) Preparation of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method and the drug release behaviour. *J. Control Release.* 25: 89-98.
- (82) Mei, L., Sun, H. & Song, C. (2008) Local delivery of modified paclitaxel-loaded poly(epsilon-caprolactone)/pluronic F68 nanoparticles for long-term inhibition of hyperplasia. *J. Pharm. Sci.*
- (83) Jimenez, M.M., Pelletier, J., Bobin, M.F., Martini, M.C. & Fessi, H. (2004) Poly-epsilon-caprolactone nanocapsules containing octyl methoxycinnamate: preparation and characterization. *Pharm. Dev. Technol.* 9: 329-39.
- (84) van der Ende, A.E., Kravitz, E.J. & Harth, E. (2008) Approach to formation of multifunctional polyester particles in controlled nanoscopic dimensions. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 8706-13.
- (85) Paiphansiri, U., Tangboriboonrat, P. & Landfester, K. (2006) Polymeric nanocapsules containing an antiseptic agent obtained by controlled nanoprecipitation onto water-in-oil miniemulsion droplets. *Macromol. Biosci.* 6: 33-40.
- (86) Olvera-Martinez, B.I., Cazares-Delgadillo, J., Calderilla-Fajardo, S.B., Villalobos-Garcia, R., Ganem-Quintanar, A. & Quintanar-Guerrero, D. (2005) Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: penetration across the stratum corneum. *J. Pharm. Sci.* 94: 1552-9.
- (87) Guterres, S.S., Fessi, H., Barratt, G., Puisieux, F. & Devissaguet, J.P. (1995) Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharm. Res.* 12: 1545-7.
- (88) Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N. & Benita, S. (1989) Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55: R1-R4.

- (89) Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H.D. & Golomb, G. (2009) A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J. Control Release*. 133: 90-5.
- (90) Bilati, U., Allemann, E. & Doelker, E. (2005) Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 24: 67-75.
- (91) Avgoustakis, K. (2004) Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr. Drug Deliv.* 1: 321-33.
- (92) McCarron, P.A., Donnelly, R.F. & Marouf, W. (2006) Celecoxib-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared using a novel and controllable combination of diffusion and emulsification steps as part of the salting-out procedure. *J. Microencapsul.* 23: 480-98.
- (93) Allemann, E., Gurny, R. & Doelker, E. (1992) Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *Int. J. Pharm.* 87: 247-253.
- (94) Zweers, M.L., Engbers, G.H., Grijpma, D.W. & Feijen, J. (2006) Release of anti-restenosis drugs from poly(ethylene oxide)-poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *J. Control Release*. 114: 317-24.
- (95) Ibrahim, H., Bindschaendler, C., Doelker, E., Buri, P. & Gurny, R. (1992) Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *Int. J. Pharm.* 87: 239-246.
- (96) Konan, Y.N., Gurny, R. & Allemann, E. (2002) Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 233: 239-52.
- (97) Randolph, T.W., Randolph, A.D., Mebes, M. & Yeung, S. (1993) Sub-micrometer-sized biodegradable particles of poly(L-lactic acid) via the gas antisolvent spray precipitation process. *Biotechnol. Prog.* 9: 429-35.
- (98) Chattopadhyay, P., Huff, R. & Shekunov, B.Y. (2006) Drug encapsulation using supercritical fluid extraction of emulsions. *J. Pharm. Sci.* 95: 667-79.
- (99) Liu, H., Finn, N. & Yates, M.Z. (2005) Encapsulation and sustained release of a model drug, indomethacin, using CO₂-based microencapsulation. *Langmuir*. 21: 379-85.
- (100) Thote, A.J. & Gupta, R.B. (2005) Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release. *Nanomedicine*. 1: 85-90.
- (101) Meziani, M.J. & Sun, Y.P. (2003) Protein-conjugated nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution into aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 8015-8.

- (102) Peltonen, L. & Hirvonen, J. (2008) Physicochemical characterization of nano- and microparticles. *Current Nanoscience*. 4: 101-107.
- (103) Ito, T., Sun, L., Bevan, M.A. & Crooks, R.M. (2004) Comparison of nanoparticle size and electrophoretic mobility measurements using a carbon-nanotube-based coulter counter, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and phase analysis light scattering. *Langmuir*. 20: 6940-6945.
- (104) Peltonen, L., Koistinen, P. & Hirvonen, J. (2003) Preparation of nanoparticles by the nanoprecipitation of low molecular weight poly(l)lactide. *STP Pharma. Sci.* 13: 299-304.
- (105) Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M.C., Illum, L. & Davis, S.S. (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Controlled Release*. 57: 171-185.
- (106) Ren, J., Hong, H., Song, J. & Ren, T. (2005) Particle size and distribution of biodegradable poly-D,L-lactide-co-poly(ethylene glycol) block polymer nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *J. Appl. Polym. Sci.* 98: 1884-1890.
- (107) Mosqueira, V.C.F., Legrand, P., Pinto-Alphandary, H., Puisieux, F. & Barratt, G. (2000) Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci.* 89: 614-626.
- (108) Gref, R. & Couvreur, P. (2006) Nanocapsules: Preparation, Characterization and Therapeutic Applications. In: Nanoparticulates as drug carriers (ed. V Torchilin), pp 255-276. Imperial College Press, London.
- (109) Murthy, R.S.R. & Reddy, L.H. (2006) Poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for delivery of anti-cancer drugs. In: Nanotechnology for cancer therapy (ed. MM Amiji). CRC Press, Boca Raton.
- (110) Chávez, F., Olvera, B.I., Ganem, A. & Quintanar, D. (2002) Liberación de sustancias lipofílicas a partir de nanocápsulas poliméricas. *Rev. Soc. Quim. Méx.* 46.
- (111) Quintanar-Guerrero, D., Allemann, E., Doelker, E. & Fessi, H. (1998) Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm. Res.* 15: 1056.
- (112) Sant, S., Nadeau, W. & Hildgen, P. (2005) Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles. *J. Control Release*. 107: 203-214.
- (113) Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R. & Delie, F. (2008) Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69: 1-9.

- (114) Abdelwahed, W., Degobert, G. & Fessi, H. (2006) Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63: 87-94.
- (115) Santander-Ortega, M.J., Jódar-Reyes, A.B., Csabac, N., Bastos-González, D. & Ortega-Vinuesa, J.L. (2006) Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms. *J. Colloid and Interface Science.* 302: 522-529.
- (116) Pecora, R. (2000) Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *J. Nanoparticle Res.* 2: 123-131.
- (117) Stechemesser, H. & Sonntag, H. (2005) Coagulation Kinetics. In: Coagulation and Flocculation. Vol. 126 (eds. H Stechemesser, B Dobias), pp 72-126. CRC Press, Boca Raton.
- (118) Liu, W., Sun, D., Li, C., Liu, Q. & Xu, J. (2006) Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. *J. Colloid Interface Sci.* 303: 557-563.
- (119) Ishikawa, Y., Katoh, Y. & Ohshima, H. (2005) Colloidal stability of aqueous polymeric dispersions: effect of pH and salt concentration. *Colloid Surf. B.* 42: 53-58.
- (120) Hirsjarvi, S., Peltonen, L. & Hirvonen, J. (2006) Layer-by-layer polyelectrolyte coating of low molecular weight poly(lactic acid) nanoparticles. *Colloids and surfaces B-Biointerfaces.* 49: 93-99.
- (121) Giannavola, C., Bucolo, C., Maltese, A., Paolino, D., Vandelli, M.A., Puglisi, G., Lee, V.H.L. & Fresta, M. (2003) Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-D,L-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm. Res.* 20: 584-590.
- (122) Kreuter, J. (1994) Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker, New York.
- (123) Siepman, J., Faisant, N. & Benoit, J.P. (2002) A new mathematical model quantifying drug release from bioerodible microparticles using Monte Carlo simulations. *Pharm. Res.* 19: 1885-1893.
- (124) Magenheimer, B., Levy, M.Y. & Benita, S. (1993) A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers - ultrafiltration technique at low pressure. *Int. J. Pharm.* 94: 115-123.
- (125) Gref, R., Quellec, P., Sanchez, A., Calvo, P., Dellacherie, E. & Alonso, M.J. (2001) Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51: 118-118.

- (126) Fresta, M., Puglisi, G., Giammona, G., Cavallaro, G., Micali, N. & Furneri, P.M. (1995) Pefloxacin mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: characterization of the colloidal drug carrier formulation. *J. Pharm. Sci.* 84: 895-902.
- (127) Betancourt, T., Doiron, A., Kimberly, A.H. & Brannon-Peppas, L. (2009) Controlled Release and Nanotechnology In: *Nanotechnology in Drug Delivery* (eds. MM Villiers, P Aramwit, GS Kwon), pp 83-312. Springer, New York.
- (128) Lu, X.F., Lv, X.Q., Sun, Z.J. & Zheng, Y.F. (2008) Nanocomposites of poly(L-lactide) and surface-grafted TiO₂ nanoparticles: Synthesis and characterization. *Eur. Polymer J.* 4: 2476-2481.
- (129) Das, S.K., Tucker, I.G., Hill, D.J.T. & Ganguly, N. (1995) Evaluation of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles for mucoadhesive ocular drug delivery. I. Effect of formulation variables on physicochemical characteristics of nanoparticles. *Pharm. Res.* 12: 534-540.
- (130) Dubernet, C. (1995) Thermoanalysis of microspheres. *Thermochim. Acta.* 248: 259-269.
- (131) Mu, L. & Feng, S.S. (2003) A novel controlled release formulation for the anti-cancer drug paclitaxel (Taxol[®]): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J. Controlled Release.* 86: 33-48.
- (132) Brown, M.E. (2001) *Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications* Kluwer Academics, Dordrecht, The Netherlands.
- (133) Layre, A.M., Gref, R., Richard, J., Requier, D., Chacun, H., Appel, M., Domb, A.J. & Couvreur, P. (2005) Nanoencapsulation of a crystalline drug. *Int. J. Pharm.* 298: 323-327.
- (134) Peltonen, L., Koistinen, P., Karjalainen, M., Hakkinen, A. & Hirvonen, J. (2002) The Effect of Cosolvents on the Formulation of Nanoparticles From Low-Molecular-Weight Poly(l)lactide. *AAPS PharmSciTech.* 3, article 32.
- (135) Cormode, D.P., Skajaa, T., Fayad, Z.A. & Mulder, W.J. (2008) Nanotechnology in Medical Imaging. *Probe Design and Applications. Arterioscler Thromb Vasc Biol.*
- (136) Matsuura, N. & Rowlands, J.A. (2008) Towards new functional nanostructures for medical imaging. *Med. Phys.* 35: 4474-87.
- (137) Sharma, P., Brown, S., Walter, G., Santra, S. & Moudgil, B. (2006) Nanoparticles for bioimaging. *Adv. Colloid Interface Sci.* 123-126: 471-85.
- (138) Debbage, P. & Jaschke, W. (2008) Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors. *Histochem. Cell Biol.* 130. 845-75.
- (139) Roszek, B., H. d.J.W. & Geertsman, R.E. (2005) Nanotechnology in medical applications: state-of-the art in material an devices. *RIVM Report, 265001001/2005.*

- (140) Ersoy, H. & Rybicki, F.J. (2007) Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J. Magn. Reson. Imaging*. 26: 1190-7.
- (141) Doiron, A.L., Chu, K., Ali, A. & Brannon-Peppas, L. (2008) Preparation and initial characterization of biodegradable particles containing gadolinium-DTPA contrast agent for enhanced MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 105: 17232-7.
- (142) Zhang, G., Zhang, R., Wen, X., Li, L. & Li, C. (2008) Micelles based on biodegradable poly(L-glutamic acid)-b-poly(lactide) with paramagnetic Gd ions chelated to the shell layer as a potential nanoscale MRI-visible delivery system. *Bio-macromolecules*. 9: 36-42.
- (143) Bulte, J.W. & Kraitchman, D.L. (2004) Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed*. 17: 484-99.
- (144) Ai, H., Flask, C., Weinberg, R., Shuai, X., Pagel, M., Farrell, D., Duerk, J. & Gao, J. (2005) Magnetite-loaded polymeric micelles as ultrasensitive magnetic-resonance probes. *Adv. Mater*. 17: 1949-1952.
- (145) Hamoudeh, M., Al Faraj, A., Canet-Soulas, E., Bessueille, F., Leonard, D. & Fessi, H. (2007) Elaboration of PLLA-based superparamagnetic nanoparticles: characterization, magnetic behaviour study and in vitro relaxivity evaluation. *Int. J. Pharm*. 338: 248-57.
- (146) Lee, S.-J., Jeong, J.-R., Shin, S.-C., Kim, J.-C., Chang, Y.-H., Lee, K.-H., Kim & J.-D. (2005) Magnetic enhancement of iron oxide nanoparticles encapsulated with poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Colloids and Surface A: Physicochem. Eng. Aspects*. 225: 19-25.
- (147) Patel, D., Moon, Y.J., Chang, Y., Kim, T.J. & Lee, G.H. (2008) Poly(D,L-lactide-co-glycolide) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vivo study as MRI contrast agent. *Colloids and Surface A: Physicochem. Eng. Aspects*. 313-314: 91-94.
- (148) Torchilin, V.P. (2002) PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 54: 235-52.
- (149) Nasongkla, N., Bey, E., Ren, J., Ai, H., Khemtong, C., Guthi, J.S., Chin, S.F., Sherry, A.D., Boothman, D.A. & Gao, J. (2006) Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano Lett*. 6: 2427-30.
- (150) Yang, J., Lee, C.H., Park, J., Seo, S., Lim, E.K., Song, Y.J., Suh, J.S., Yoon, H.G., Huh, Y.M. & Haam, S. (2007) Antibody conjugated magnetic PLGA nanoparticles for diagnosis and treatment of breast cancer. *J. Mater. Chem*. 17: 2695-2699.

- (151) Hong, G., Yuan, R., Liang, B., Shen, J., Yang, X. & Shuai, X. (2008) Folate-functionalized polymeric micelle as hepatic carcinoma-targeted, MRI-ultrasensitive delivery system of antitumor drugs. *Biomed. Microdevices*. 10: 693-700.
- (152) Efros, A.L. & Rosen, M. (2000) The electronic structure of semiconductor nanocrystals. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 30: 475-521.
- (153) Murray, C.B., R. K.C. & Bawendi, M.G. (2000) Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 30: 545-610.
- (154) Pan, J. & Feng, S.S. (2008) Targeting and imaging cancer cells by Folate-decorated, quantum dots (QDs)- loaded nanoparticles of biodegradable polymers. *Biomaterials*.
- (155) Hamoudeh, M., Kamleh, M.A., Diab, R. & Fessi, H. (2008) Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 1329-46.
- (156) Park, Y.J., Lee, J.Y., Chang, Y.S., Jeong, J.M., Chung, J.K., Lee, M.C., Park, K.B. & Lee, S.J. (2002) Radioisotope carrying polyethylene oxide-polycaprolactone copolymer micelles for targetable bone imaging. *Biomaterials*. 23: 873-9.
- (157) Schutt, E.G., Klein, D.H., Mattrey, R.M. & Riess, J.G. (2003) Injectable Microbubbles as Contrast Agents for Diagnostic Ultrasound Imaging: The Key Role of Perfluorochemicals13. *Angewandte Chemie International Edition*. 42: 3218-3235.
- (158) Raisinghani, A. & DeMaria, A.N. (2002) Physical principles of microbubble ultrasound contrast agents. *Am. J. Cardiol.* 90: 3J-7J.
- (159) Kaufmann, B.A. & Lindner, J.R. (2007) Molecular imaging with targeted contrast ultrasound. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18: 11-6.
- (160) Liu, J., Li, J., Rosol, T.J., Pan, X. & Voorhees, J.L. (2007) Biodegradable nanoparticles for targeted ultrasound imaging of breast cancer cells in vitro. *Phys. Med. Biol.* 52. 4739-47.
- (161) Gao, Z., Kennedy, A.M., Christensen, D.A. & Rapoport, N.Y. (2008) Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy. *Ultrasonics*. 48: 260-70.
- (162) Mulder, W.J., Cormode, D.P., Hak, S., Lobatto, M.E., Silvera, S. & Fayad, Z.A. (2008) Multimodality nanotracers for cardiovascular applications. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 5 Suppl 2: S103-11.
- (163) Cheon, J. & Lee, J.H. (2008) Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology. *Acc. Chem. Res.*

- (164) Cheng, F.-Y., Wang, S.P.-H., Su, C.-H., Tsai, T.-L., Wu, P.-C., Shieh, D.-B., Chen, J.-H., Hsieh, P.C.-H. & Yeh, C.-S. (2008) Stabilizer-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for multimodal biomedical probes. *Biomaterials*. 29: 2104-2112.
- (165) Lim, Y.T., Noh, Y.W., Han, J.H., Cai, Q.Y., Yoon, K.H. & Chung, B.H. (2008) Biocompatible polymer-nanoparticle-based bimodal imaging contrast agents for the labeling and tracking of dendritic cells. *Small*. 4: 1640-5.
- (166) Park, H., Yang, J., Seo, S., Kim, K., Suh, J., Kim, D., Haam, S. & Yoo, K.H. (2008) Multifunctional nanoparticles for photothermally controlled drug delivery and magnetic resonance imaging enhancement. *Small*. 4: 192-6.
- (167) Yang, J., Lim, E.K., Lee, H.J., Park, J., Lee, S.C., Lee, K., Yoon, H.G., Suh, J.S., Huh, Y.M. & Haam, S. (2008) Fluorescent magnetic nanohybrids as multimodal imaging agents for human epithelial cancer detection. *Biomaterials*. 29: 2548-55.
- (168) Frullano, L. & Meade, T.J. (2007) Multimodal MRI contrast agents. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12: 939-49.
- (169) Venier-Julienne, M.C., Vouldoukis, I., Monjour, L. & Benoit, J.P. (1995) In vitro study of the anti-leishmanial activity of biodegradable nanoparticles. *J. Drug Target*. 3: 23-9.
- (170) Espuelas, M.S., Legrand, P., Loiseau, P.M., Bories, C., Barratt, G. & Irache, J.M. (2002) In vitro antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(epsilon-caprolactone) nanospheres. *J. Drug Target*. 10: 593-9.
- (171) Rodrigues, J.M. Jr., Croft, S.L., Fessi, H., Bories, C. & Devissaguet, J.P. (1994) The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly (d,l-lactide) nanoparticles in *Leishmania donovani* infected mice. *Trop. Med. Parasitol.* 45: 223-8.
- (172) Cauchetier, E., Paul, M., Rivollet, D., Fessi, H., Astier, A. & Deniau, M. (2003) Therapeutic evaluation of free and nanocapsule-encapsulated atovaquone in the treatment of murine visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97: 259-68.
- (173) Tyagi, R., Lala, S., Verma, A.K., Nandy, A.K., Mahato, S.B., Maitra, A. & Basu, M.K. (2005) Targeted delivery of arjunglucoside I using surface hydrophilic and hydrophobic nanocarriers to combat experimental leishmaniasis. *J. Drug Target*. 13: 161-71.
- (174) Gaspar, M.M., Cruz, A., Fraga, A.G., Castro, A.G., Cruz, M.E. & Pedrosa, J. (2008) Developments on drug delivery systems for the treatment of mycobacterial infections. *Curr. Top. Med. Chem.* 8: 579-91.
- (175) Pandey, R. & Khuller, G.K. (2007) Nanoparticle-based oral drug delivery system for an injectable antibiotic - streptomycin. Evaluation in a murine tuberculosis model. *Chemotherapy*. 53: 437-41.

- (176) Pandey, R., Sharma, A., Zahoor, A., Sharma, S., Khuller, G.K. & Prasad, B. (2003) Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 981-6.
- (177) Lecaroz, C., Gamazo, C., Renedo, M.J. & Blanco-Prieto, M.J. (2006) Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for gentamicin. *J. Microencapsul.* 23: 782-92.
- (178) Jeong, Y.I., Na, H.S., Seo, D.H., Kim, D.G., Lee, H.C., Jang, M.K., Na, S.K., Roh, S.H., Kim, S.I. & Nah, J.W. (2008) Ciprofloxacin-encapsulated poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *Int. J. Pharm.* 352: 317-23.
- (179) Pillai, R.R., Somayaji, S.N., Rabinovich, M., Hudson, M.C. & Gonsalves, K.E. (2008) Nafcillin-loaded PLGA nanoparticles for treatment of osteomyelitis. *Bio-med. Mater.* 3: 034114.
- (180) Halder, K.K., Mandal, B., Debnath, M.C., Bera, H., Ghosh, L.K. & Gupta, B.K. (2008) Chloramphenicol-incorporated poly lactide-co-glycolide (PLGA) nanoparticles: formulation, characterization, technetium-99m labeling and biodistribution studies. *J. Drug Target.* 16: 311-20.
- (181) Esmaili, F., Hosseini-Nasr, M., Rad-Malekshahi, M., Samadi, N., Atyabi, F. & Dinarvand, R. (2007) Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. *Nanomedicine.* 3: 161-7.
- (182) Li, X., Xu, Y., Chen, G., Wei, P. & Ping, Q. (2008) PLGA nanoparticles for the oral delivery of 5-Fluorouracil using high pressure homogenization-emulsification as the preparation method and in vitro/in vivo studies. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34: 107-15.
- (183) Dong, Y. & Feng, S.S. (2007) Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles prepared by high pressure homogenization for paclitaxel chemotherapy. *Int. J. Pharm.* 342: 208-14.
- (184) Kou, G., Gao, J., Wang, H., Chen, H., Li, B., Zhang, D., Wang, S., Hou, S., Qian, W., Dai, J., Zhong, Y. & Guo, Y. (2007) Preparation and Characterization of Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles coated with cationic SM5-1 single-chain antibody. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40: 731-9.
- (185) Jin, C., Wu, H., Liu, J., Bai, L. & Guo, G. (2007) The effect of paclitaxel-loaded nanoparticles with radiation on hypoxic MCF-7 cells. *J. Clin. Pharm. Ther.* 32: 41-7.
- (186) Jin, C., Bai, L., Wu, H., Liu, J., Guo, G. & Chen, J. (2008) Paclitaxel-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for radiotherapy in hypoxic human tumor cells in vitro. *Cancer Biol. Ther.* 7: 911-6.

- (187) Dhar, S., Gu, F.X., Langer, R., Farokhzad, O.C. & Lippard, S.J. (2008) Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105: 17356-61.
- (188) Gryparis, E.C., Hatziapostolou, M., Papadimitriou, E. & Avgoustakis, K. (2007) Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67: 1-8.
- (189) Gryparis, E.C., Mattheolabakis, G., Bikiaris, D. & Avgoustakis, K. (2007) Effect of conditions of preparation on the size and encapsulation properties of PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin. *Drug Deliv.* 14: 371-80.
- (190) Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A.G. & Ithakissios, D.S. (2002) PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J. Control Release.* 79: 123-35.
- (181) Yoo, H.S., Lee, K.H., Oh, J.E. & Park, T.G. (2000) In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *J. Control Release.* 68: 419-31.
- (192) Betancourt, T., Brown, B. & Brannon-Peppas, L. (2007) Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation. *Nanomed.* 2, 219-32.
- (193) Yadav, A.K., Mishra, P., Mishra, A.K., Mishra, P., Jain, S. & Agrawal, G.P. (2007) Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedicine.* 3: 246-57.
- (194) McCarron, P.A., Marouf, W.M., Quinn, D.J., Fay, F., Burden, R.E., Olwill, S.A. & Scott, C.J. (2008) Antibody targeting of camptothecin-loaded PLGA nanoparticles to tumor cells. *Bioconjug. Chem.* 19: 1561-9.
- (195) Esmaili, F., Ghahremani, M.H., Ostad, S.N., Atyabi, F., Seyedabadi, M., Malekshahi, M.R., Amini, M. & Dinarvand, R. (2008) Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *J. Drug Target.* 16: 415-23.
- (196) Davaran, S., Rashidi, M.R., Pourabbas, B., Dadashzadeh, M. & Haghshenas, N.M. (2006) Adriamycin release from poly(lactide-coglycolide)-polyethylene glycol nanoparticles: synthesis, and in vitro characterization. *Int. J. Nanomedicine.* 1: 535-9.
- (197) Shenoy, D.B. & Amiji, M.M. (2005) Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int. J. Pharm.* 293: 261-70.
- (198) Li, X., Li, R., Qian, X., Ding, Y., Tu, Y., Guo, R., Hu, Y., Jiang, X., Guo, W. & Liu, B. (2008) Superior antitumor efficiency of cisplatin-loaded nanoparticles by

- intratumoral delivery with decreased tumor metabolism rate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70: 726-34.
- (199) Kim, S.Y. & Lee, Y.M. (2001) Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(epsilon-caprolactone) as novel anticancer drug carriers. *Biomaterials.* 22: 1697-704.
- (200) Feng, N., Wu, P., Li, Q., Mei, Y., Shi, S., Yu, J., Xu, J., Liu, Y. & Wang, Y. (2008) Oridonin-loaded poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(epsilon-caprolactone) copolymer nanoparticles: preparation, characterization, and antitumor activity on mice with transplanted hepatoma. *J. Drug Target.* 16: 479-85.
- (201) Kreuter, J. & Gelperina, S. (2008) Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori.* 94: 271-7.
- (202) Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J. & Kristl, J. (2007) Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J. Control Release.* 120: 18-26.
- (203) Gao, J., Kou, G., Chen, H., Wang, H., Li, B., Lu, Y., Zhang, D., Wang, S., Hou, S., Qian, W., Dai, J., Zhao, J., Zhong, Y. & Guo, Y. (2008) Treatment of hepatocellular carcinoma in mice with PE38KDEL type I mutant-loaded poly(lactico-glycolic acid) nanoparticles conjugated with humanized SM5-1 F(ab') fragments. *Mol. Cancer Ther.* 7: 3399-407.
- (204) Chen, H., Gao, J., Lu, Y., Kou, G., Zhang, H., Fan, L., Sun, Z., Guo, Y. & Zhong, Y. (2008) Preparation and characterization of PE38KDEL-loaded anti-HER2 nanoparticles for targeted cancer therapy. *J. Control Release.* 128: 209-16.
- (205) Townsend, S.A., Evrony, G.D., Gu, F.X., Schulz, M.P., Brown, R.H. Jr. & Langer, R. (2007) Tetanus toxin C fragment-conjugated nanoparticles for targeted drug delivery to neurons. *Biomaterials.* 28, 5176-84.
- (206) Gu, F., Zhang, L., Teply, B.A., Mann, N., Wang, A., Radovic-Moreno, A.F., Langer, R. & Farokhzad, O.C. (2008) Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105: 2586-91.
- (207) Hamoudeh, M., Salim, H., Barbos, D., Paunoiu, C. & Fessi, H. (2007) Preparation and characterization of radioactive dirhenium decacarbonyl-loaded PLLA nanoparticles for radionuclide intra-tumoral therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67: 597-611.
- (208) McCarthy, J.R., Perez, J.M., Bruckner, C. & Weissleder, R. (2005) Polymeric nanoparticle preparation that eradicates tumors. *Nano Lett.* 5: 2552-6.
- (209) Ricci-Junior, E. & Marchetti, J.M. (2006) Preparation, characterization, phototoxicity assay of PLGA nanoparticles containing zinc (II) phthalocyanine for photodynamic therapy use. *J. Microencapsul.* 23: 523-38.

- (210) Panyam, J. & Labhasetwar, V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 329-47.
- (211) Song, C., Labhasetwar, V., Cui, X., Underwood, T. & Levy, R.J. (1998) Arterial uptake of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery: results with an acute dog model. *J. Control Release.* 54: 201-11.
- (212) Varshosaz, J. & Soheili, M. (2008) Production and in vitro characterization of lisinopril-loaded nanoparticles for the treatment of restenosis in stented coronary arteries. *J. Microencapsul.* 1-9.
- (213) Westedt, U., Kalinowski, M., Wittmar, M., Merdan, T., Unger, F., Fuchs, J., Schaller, S., Bakowsky, U. & Kissel, T. (2007) Poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for local delivery of paclitaxel for restenosis treatment. *J. Control Release.* 119: 41-51.
- (214) Cohen-Sela, E., Rosenzweig, O., Gao, J., Epstein, H., Gati, I., Reich, R., Danenberg, H.D. & Golomb, G. (2006) Alendronate-loaded nanoparticles deplete monocytes and attenuate restenosis. *J. Control Release.* 113: 23-30.
- (215) Fishbein, I., Chorny, M., Rabinovich, L., Banai, S., Gati, I. & Golomb, G. (2000) Nanoparticulate delivery system of a tyrophostin for the treatment of restenosis. *J. Control Release.* 65: 221-9.
- (216) Yang, J., Zeng, Y., Li, Y., Song, C., Zhu, W., Guan, H. & Li, X. (2008) Intravascular site-specific delivery of a therapeutic antisense for the inhibition of restenosis. *Eur. J. Pharm. Sci.* 35: 427-34.
- (217) Cohen-Sacks, H., Najajreh, Y., Tchaikovski, V., Gao, G., Elazer, V., Dahan, R., Gati, I., Kanaan, M., Waltenberger, J. & Golomb, G. (2002) Novel PDGFbetaR antisense encapsulated in polymeric nanospheres for the treatment of restenosis. *Gene Ther.* 9: 1607-16.
- (218) Labhasetwar, V., Song, C., Humphrey, W., Shebuski, R. & Levy, R.J. (1998) Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: effect of surface modifications. *J. Pharm. Sci.* 87: 1229-34.
- (219) Merican, I., Guan, R., Amarapuka, D., Alexander, M.J., Chutaputti, A., Chien, R.N., Hasnian, S.S., Leung, N., Lesmana, L., Phiet, P.H., Sjalfoellah Noer, H.M., Sollano, J., Sun, H.S. & Xu, D.Z. (2000) Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15: 1356-61.
- (220) Chong, C.S., Cao, M., Wong, W.W., Fischer, K.P., Addison, W.R., Kwon, G.S., Tyrrell, D.L. & Samuel, J. (2005) Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. *J. Control Release.* 102: 85-99.

- (221) Bharali, D.J., Pradhan, V., Elkin, G., Qi, W., Hutson, A., Mousa, S.A. & Thanavala, Y. (2008) Novel nanoparticles for the delivery of recombinant hepatitis B vaccine. *Nanomedicine*. 4, 311-7.
- (222) Bharali, D.J., Mousa, S.A. & Thanavala, Y. (2007) Micro- and nanoparticle-based vaccines for hepatitis B. *Adv. Exp. Med. Biol.* 601: 415-21.
- (223) Gupta, P.N., Khatri, K., Goyal, A.K., Mishra, N. & Vyas, S.P. (2007) M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *J. Drug Target*. 15: 701-13.
- (224) Gupta, P.N., Mahor, S., Rawat, A., Khatri, K., Goyal, A. & Vyas, S.P. (2006) Lectin anchored stabilized biodegradable nanoparticles for oral immunization 1. Development and in vitro evaluation. *Int. J. Pharm.* 318: 163-73.
- (225) Singh, J., Pandit, S., Bramwell, V.W. & Alpar, H.O. (2006) Diphtheria toxoid loaded poly-(epsilon-caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems. *Methods*. 38: 96-105.
- (226) Nayak, B., Panda, A.K., Ray, P. & Ray A.R. (2008) Formulation, characterization and evaluation of rotavirus encapsulated PLA and PLGA particles for oral vaccination. *J. Microencapsul.* 1-12.
- (227) Diwan, M., Elamanchili, P., Lane, H., Gainer, A. & Samuel, J. (2003) Biodegradable nanoparticle mediated antigen delivery to human cord blood derived dendritic cells for induction of primary T cell responses. *J. Drug Target*. 11: 495-507.
- (228) Elamanchili, P., Diwan, M., Cao, M. & Samuel, J. (2004) Characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine*. 22: 2406-12.
- (229) Elamanchili, P., Lutsiak, C.M., Hamdy, S., Diwan, M. & Samuel, J. (2007) «Pathogen-mimicking» nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *J. Immunother.* 30: 378-95.
- (230) Diwan, M., Elamanchili, P., Cao, M. & Samuel, J. (2004) Dose sparing of CpG oligodeoxynucleotide vaccine adjuvants by nanoparticle delivery. *Curr. Drug Deliv.* 1: 405-12.
- (231) Hamdy, S., Molavi, O., Ma, Z., Haddadi, A., Alshamsan, A., Gobti, Z., Elhasi, S., Samuel, J. & Lavasanifar, A. (2008) Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8+ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine*. 26: 5046-57.
- (232) Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. (2006) Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control Release*. 114: 100-9.
- (233) Zhang, S., Zhao, B., Jiang, H., Wang, B. & Ma, B. (2007) Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J. Control Release*. 123: 1-10.

- (234) Goyal, A.K., Khatri, K. & Vyas, S.P. (2008) Patents on non-viral mediated gene delivery. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 2: 44-60.
- (235) Montier, T., Benvegna, T., Jaffres, P.A., Yaouanc, J.J. & Lehn, P. (2008) Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: a series of bio-inspired lipids as an example. *Curr. Gene Ther.* 8: 296-312.
- (236) Wasungu, L. & Hoekstra, D. (2006) Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Control Release.* 116, 255-64.
- (237) Yi, F., Wu, H. & Jia, G.L. (2006) Formulation and characterization of poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticle containing vascular endothelial growth factor for gene delivery. *J. Clin. Pharm. Ther.* 31: 43-8.
- (238) Csaba, N., Sanchez, A. & Alonso, M.J. (2006) PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. *J. Control Release.* 113: 164-72.
- (239) Gvili, K., Benny, O., Danino, D. & Machluf, M. (2007) Poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for DNA delivery: waiving preparation complexity and increasing efficiency. *Biopolymers.* 85: 379-91.
- (240) He, Q., Yuan, W.M., Liu, J. & Zhang, Z.R. (2008) Study on in vivo distribution of liver-targeting nanoparticles encapsulating thymidine kinase gene (TK gene) in mice. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19: 559-65.
- (241) Basarkar, A. & Singh, J. (2009) Poly (lactide-co-glycolide)-Polymethacrylate Nanoparticles for Intramuscular Delivery of Plasmid Encoding Interleukin-10 to Prevent Autoimmune Diabetes in Mice. *Pharm. Res.* 26: 72-81.
- (242) Nafee, N., Taetz, S., Schneider, M., Schaefer, U.F. & Lehr, C.M. (2007) Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine.* 3: 173-83.
- (243) Taetz, S., Nafee, N., Beisner, J., Piotrowska, K., Baldes, C., Murdter, T.E., Huwer, H., Schneider, M., Schaefer, U.F., Klotz, U. & Lehr, C.M. (2008) The influence of chitosan content in cationic chitosan/PLGA nanoparticles on the delivery efficiency of antisense 2'-O-methyl-RNA directed against telomerase in lung cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*
- (244) Yuan, X., Li, L., Rathinavelu, A., Hao, J., Narasimhan, M., He, M., Heitlage, V., Tam, L., Viqar, S. & Salehi, M. (2006) siRNA drug delivery by biodegradable polymeric nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 2821-8.
- (245) Nguyen, J., Steele, T.W., Merkel, O., Reul, R. & Kissel, T. (2008) Fast degrading polyesters as siRNA nano-carriers for pulmonary gene therapy. *J. Control Release.*

- (246) Katas, H., Cevher, E. & Alpar, H.O. (2008) Preparation of polyethyleneimine incorporated poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles by spontaneous emulsion diffusion method for small interfering RNA delivery. *Int. J. Pharm.*
- (247) Yadav, S., van Vlerken, L.E., Little, S.R. & Amiji, M.M. (2008) Evaluations of combination MDR-1 gene silencing and paclitaxel administration in biodegradable polymeric nanoparticle formulations to overcome multidrug resistance in cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*
- (248) Panyam, J., Zhou, W.Z., Prabha, S., Sahoo, S.K. & Labhasetwar, V. (2002) Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J.* 16: 1217-26.
- (249) Vasir, J.K. & Labhasetwar, V. (2007) Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 718-28.
- (250) Prabha, S., Zhou, W.Z., Panyam, J. & Labhasetwar, V. (2002) Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 244: 105-15.
- (251) Prabha, S. & Labhasetwar, V. (2004) Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression. *Pharm. Res.* 21: 354-64.
- (252) Caputo, A., Sparnacci, K., Ensoli, B. & Tondelli, L. (2008) Functional polymeric nano/microparticles for surface adsorption and delivery of protein and DNA vaccines. *Curr. Drug Deliv.* 5: 230-42.
- (253) Mok, H. & Park, T.G. (2008) Direct plasmid DNA encapsulation within PLGA nanospheres by single oil-in-water emulsion method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68: 105-11.
- (254) Ribeiro, S., Rijpkema, S.G., Durrani, Z. & Florence, A.T. (2007) PLGA-dendron nanoparticles enhance immunogenicity but not lethal antibody production of a DNA vaccine against anthrax in mice. *Int. J. Pharm.* 331: 228-32.
- (255) Mark, C. & Smales, D.C.J. (2005) Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. Humana Press.
- (256) Banga, A.K. (2005) Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems CRC Press.
- (257) Niazi, S. (2005) Handbook of Biogeneric Therapeutic Proteins: Regulatory, Manufacturing, Testing, and Patent Issues. Taylor & Francis.
- (258) Kumar, P.S., Ramakrishna, S., Saini, T.R. & Diwan, P.V. (2006) Influence of microencapsulation method and peptide loading on formulation of poly(lactide-co-glycolide) insulin nanoparticles. *Pharmazie.* 61: 613-7.
- (259) Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K. & Nagai, T. (1999) Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25: 471-6.

- (260) Cui, F., Shi, K., Zhang, L., Tao, A. & Kawashima, Y. (2006) Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *J. Control Release*. 114: 242-50.
- (261) Pan, Y., Xu, H., Zhao, H.Y., Wei, G. & Zheng, J.M. (2002) [Study on preparation and oral efficacy of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles]. *Yao Xue Xue Bao*. 37: 374-7.
- (262) Rytting, E., Nguyen, J., Wang, X. & Kissel, T. (2008) Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv*. 5: 629-39.
- (263) 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: 373-81.
- (264) Sanchez, A., Tobio, M., Gonzalez, L., Fabra, A. & Alonso, M.J. (2003) Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. *Eur. J. Pharm. Sci*. 18: 221-9.
- (265) Son, S., Lee, W.R., Joung, Y.K., Kwon, M.H., Kim, Y.S. & Park, K.D. (2008) Optimized stability retention of a monoclonal antibody in the PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.*
- (266) Reddy, M.K., Wu, L., Kou, W., Ghorpade, A. & Labhasetwar, V. (2008) Superoxide dismutase-loaded PLGA nanoparticles protect cultured human neurons under oxidative stress. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 151: 565-77.