



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TENDENCIAS EN LA ADMINISTRACIÓN PULMONAR DE MEDICAMENTOS
BIOTECNOLÓGICOS

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Salvador Alvarez Alquicira



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: María del Socorro Alpizar Ramos**

VOCAL: **Profesor: Viridiana Gisela Llera Rojas**

SECRETARIO: **Profesor: Elsa Flores Marroquín**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Carlos Jasso Martínez**

2° SUPLENTE: **Profesor: Susana Prudenciana Flores Otero**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA, EDIFICIO A, PLANTA BAJA,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. María del Socorro Alpizar Ramos

SUSTENTANTE (S):

Salvador Alvarez Alquicira

Índice

Objetivo General	1
Objetivos Particulares	1
Capítulo 1. Justificación	2
Capítulo 2. Antecedentes	4
2.1 La Revolución Biofarmacéutica	7
2.2 Medicamentos Convencionales vs. Medicamentos Biotecnológicos	9
2.3 Administración de Medicamentos Biotecnológicos	10
2.3.1 Parenteral	11
2.3.2 Oral	12
2.3.3 Bucal	13
2.3.4 Ocular	13
2.3.5 Transdérmica y Tópica	14
2.3.6 Nasal	15
Capítulo 3. Administración Pulmonar	16
3.1 Antecedentes	17
3.2 Dispositivos para Liberación Pulmonar	17
3.2.1 Inhaladores de Dosis Medidas (IDM)	19
3.2.2 Inhaladores de Polvo Seco (DPI)	21
3.2.3 Nebulizador	23
3.3 Retos en la Formulación de Proteínas Inhalables	24
3.3.1 Degradación Físicoquímica	25
3.3.2 Estrategias para Superar la Degradación Físicoquímica	27
3.4 Factores que Afectan la Disponibilidad de Compuestos de Naturaleza Peptídica Administrados por Vía Pulmonar	35
3.4.1 Deposición en el Tracto Respiratorio	35

3.4 Factores que Afectan la Disponibilidad de Compuestos de Naturaleza Peptídica Administrados por Vía Pulmonar (cont.)	
3.4.2 Aclaramiento Mucociliar	37
3.4.3 Macrófagos Alveolares	39
3.4.4 Actividad de Peptidasas y Proteasas	40
3.4.5 Mecanismos de Absorción en los Pulmones	41
3.5 Mercado Actual de los Medicamentos Biotecnológicos para Administración Pulmonar	42
3.5.1 Administración Local	43
3.5.1.1 Asma	43
3.5.1.2 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)	45
3.5.1.3 Hipertensión Pulmonar Arterial (HPA)	46
3.5.1.4 Fibrosis Quística	48
3.5.1.5 Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR) neonatal	50
3.5.2 Administración Sistémica	51
Capítulo 4. Afrezza®	57
4.1 Química y su Formulación	57
4.2 Farmacodinamia	58
4.3 Farmacocinética	58
4.4 Dosis y Formas Farmacéuticas	60
4.5 Ventajas y Limitaciones	60
4.5 Efectos Adversos	61
Conclusión	62
Bibliografía	63

Objetivo General.

Realizar una investigación bibliohemerográfica acerca de los avances y tendencias en la administración de medicamentos biotecnológicos por vía pulmonar.

Objetivos Particulares:

- Resaltar la importancia de la biotecnología en la industria farmacéutica.
- Enunciar las vías de administración de medicamentos biotecnológicos en la actualidad.
- Presentar los dispositivos de administración pulmonar utilizados hoy en día.
- Describir el papel de la anatomía y fisiología pulmonar en la administración de medicamentos.
- Conocer las características de los medicamentos biotecnológicos, que se encuentran en el mercado, que son administrados por esta vía para generar conocimiento base para futuros desarrollos.
- Estudiar el medicamento Afrezza®, el último medicamento biotecnológico inhalable aprobado por la FDA.

Capítulo 1. Justificación.

La biotecnología se refiere al uso de microorganismos vivos, o los productos de los mismos, para el beneficio humano (o el beneficio de su entorno) con el fin de desarrollar un producto o resolver un problema (Thieman & Palladino, 2010).

La biotecnología ha encontrado un amplio rango de aplicaciones en medicina que incluyen prevención, diagnóstico y cura de enfermedades.

En el siglo XXI se puede encontrar un gran número de péptidos y proteínas terapéuticas, ya sea en el mercado, o en etapas finales de estudios clínicos (Škalko-Basnet, 2014). Estos medicamentos, en comparación con los fármacos convencionales, tienen mayor selectividad, así como mayor eficacia, una incidencia de efectos adversos menor y un comportamiento predecible en condiciones *in vivo*.

La mayoría de estos son formulados para su uso en vía parenteral que resulta dolorosa e incómoda para el paciente. Aunado a ello, algunos biofármacos cuentan con una vida media corta en plasma que requiere de un mayor número de administraciones, provocando así una baja adherencia al tratamiento por parte del paciente. Es por ello que se está buscando la aplicación de estos medicamentos por vías de administración alternativas. El tracto respiratorio es un vía no invasiva para efecto local y sistémico que proporciona un inicio de absorción rápido y farmacocinética favorable, evitando las severas condiciones del tracto gastrointestinal y el efecto del metabolismo de primer paso ejercido por el hígado (Depreter, 2013).

En este trabajo se abordarán diversos rubros como la importancia de la biotecnología en la industria farmacéutica, la anatomía y fisiología del aparato respiratorio, y su importancia en la administración pulmonar de

moléculas peptídicas, los dispositivos de inhalación que se utilizan hoy en día y las particularidades con las que debe contar un medicamento para poder atravesar la barrera alveolo-capilar: tamaño de la molécula, la interacción con la interfase aire-líquido, la barrera mucociliar, los macrófagos alveolares, peptidasas y proteasas, así como el transporte del epitelio alveolo capilar. Además de hacer una revisión del status actual del mercado de biotecnológicos administrados por vía pulmonar para efecto local y sistémico, realizando un análisis más profundo en el producto Afrezza[®], insulina inhalable, aprobada en 2014 por la FDA.

Capítulo 2. Antecedentes

La biotecnología involucra algunas prácticas y metodologías antiguas. Los griegos, chinos, romanos, babilonios y egipcios han utilizado la disciplina desde casi el año 2000 a.C. Una forma utilizada desde ese entonces es la fermentación, para la producción de pan, queso, yogurt y bebidas alcohólicas como la cerveza y el vino. La crianza selectiva, es otra aplicación para mejorar la producción de los cultivos y ganado para propósitos alimentarios, en donde organismos con determinados rasgos son emparejados para que se reproduzcan y así obtengan diversas características deseadas.

Los principales avances en biotecnología son relativamente recientes, con el descubrimiento de los microorganismos hace alrededor de 170 años. Las proteínas fueron descubiertas en 1830, y la primer enzima fue aislada 3 años después. En 1865 Gregor Mendel descubrió las leyes de la herencia sentando las bases para la investigación genética. A finales de ese siglo Louis Pasteur y Robert Koch proporcionaron las raíces para la investigación en microbiología. A principios del siglo XX Alexander Fleming descubrió que el hongo del género *Penicillium* inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, los trabajos de éste llevaron al descubrimiento y purificación de la penicilina. En las décadas de 1950 y 1960, los avances en bioquímica y biología celular hicieron posible purificar grandes cantidades de antibióticos de muchas variedades de bacterias. Este conjunto de procesos se desarrolló para el aislamiento de moléculas comercialmente importantes a partir de microorganismos.

La revolución en biotecnología fue provocada por el descubrimiento de la estructura del DNA por Franklin, Watson y Crick (1953). Requirió además de 15 años de descubrimientos básicos adicionales. El 1972-1973 el desarrollo del DNA recombinante por Berg, Cohen y Boyer de la

Universidad de Standford y la Universidad de California. Estos investigadores descubrieron como utilizar enzimas de restricción para cortar moléculas de DNA, como utilizar otra enzima, DNA ligasa, para unir moléculas de DNA de diferentes organismos, y como introducir el rDNA (DNA recombinante) por medio de un vehículo (plásmido, fago) en *E. coli*. Esto llevó a la biotecnología a nuevas alturas y permitió el establecimiento de una nueva industria en los Estados Unidos y alrededor del mundo.

A partir de 1990 comenzó el Proyecto del Genoma Humano, un esfuerzo internacional, que tenía como uno de sus objetivos identificar todos los genes contenidos en el DNA de las células y trazar sus localizaciones para cada uno de los 24 cromosomas humanos. Dicho proyecto supone un potencial ilimitado para el desarrollo de diagnósticos para la detección de enfermedades y enfoques moleculares para el tratamiento y cura de los padecimientos del hombre.

Los descubrimientos básicos aunados a un gran entendimiento de bioquímica y biofísica han arrojado a la luz las anomalías de los sistemas biológicos altamente coordinados en humanos, relacionadas con los síntomas de enfermedades.

Tabla 1. Hitos en Biotecnología. Tabla modificada extraída de Biotechnology Fundamentals (Alam Khan, 2012).

1838	Descubrimiento de proteínas por Gerardus Johannes Mulder
1882	Descubrimiento de cromosomas por Walther Flemming
1885	Descubrimiento de bacteria <i>Escherichia coli</i> por Theodore von Escherich
1940	Avery demostró que el DNA es el "factor de transformación" y material de genes
1944	Alfred Hershey y Martha Chase demuestran que el DNA es material hereditario.
1953	La estructura de doble hélice del DNA es descrita por Watson y Crick, con la colaboración de Franklin
1957	Se descubre que la información genética pasa del DNA a las proteínas a través del RNA. Francis Crick establece el dogma central de la biología molecular.

Tabla 1. Continuación

1971	Cetus, la primer compañía biotecnológica, es fundada en Berkeley, California.
1973	Cohen and Boyer desarrollaron técnicas de ingeniería genética de "corte y pega" del DNA y reproducir el nuevo DNA en bacterias.
1976	Har Gobind Khorana y colaboradores sintetizan el primer gen funcional.
1977	Científicos de Genentech y sus colaboradores producen la primer proteína humana (somatostatina) en bacteria (<i>E. coli</i>)
1978	Científicos de Genentech y sus colaboradores producen insulina humana recombinante.
1979	Científicos de Genentech producen hormona del crecimiento humana recombinante.
1982	Eli Lilly & Company comercializan insulina humana recombinante licenciada por Genentech. El primer producto en el mercado.
1983	Concepción de la técnica de PCR por Kary Mullis.
1985	Genentech recibe aprobación por parte de FDA para protropina indicada para la deficiencia de hormona de crecimiento en niños. El primer medicamento biotecnológico elaborado y comercializado por una compañía biotecnológica.
1988	El "ratón Harvard" es el primer animal patentado en E.U. por la Universidad de Harvard
1990	El Proyecto del Genoma Humano es lanzado.
1994	BRCA1, el primer gen de susceptibilidad al cáncer de mama, fue descubierto.
1995	Se completa la primer secuenciación genética a un organismo distinto a un virus, para la bacteria <i>Haemophilus influenzae</i>
2000	El primer borrador de la secuencia del genoma humano fue completado.
2002	Se desarrolla la primer vacuna contra el cáncer cervical
2003	Presentación de la secuencia del Genoma Humano
2006	Vacuna recombinante contra el virus del papiloma humano recibe aprobación por parte de la FDA
2007	La FDA concluye que la comida derivada de animales clonados es tan segura como la que no proviene de animales no clonados.
2008	Científicos Japoneses desarrollan exitosamente la primer rosa azul genéticamente modificada.
2009	La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) aprueba un fármaco (antitrombina) producido en cabras. Se comercializan las primeras enzimas para la producción de etanol celulósico.
2010	Científicos de Estados Unidos crean la primera célula controlada por un genoma sintético.
2011	Expertos surcoreanos crean un cerdo transgénico capaz de producir órganos para trasplantes a humanos.
2012	La Administración de Alimentos y Fármacos de EE.UU. aprueba el primer medicamento producido por zanahorias genéticamente modificadas para uso en pacientes con enfermedad de Gaucher.

2.1 La Revolución Biofarmacéutica.

En 1971 Peter Farley, Ronald Cape y Donald Glaser (Ganador de Premio Nobel de Física) comercializaron la tecnología de rDNA y establecieron la Corporación Cetus en Berkeley, California, la cual, en 1985 desarrolló la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). En 1976 un gen humano fue expresado en una bacteria, y el DNA de una levadura fue replicado y expresado. En 1978 Genentech desarrolló insulina humana y un plasminógeno activador de tejido (tPA), también DNA bacteriano fue insertado exitosamente en cromosomas de levadura y Biogen fue fundada en Cambridge. Amgen fue fundada en 1980, en el mismo año, la Suprema Corte de Estados Unidos estableció que los organismos vivos podían ser patentados.

En 1982, la insulina humana recombinante estaba lista para el mercado como un esfuerzo de Genentech/Eli Lilly. Otros productos la siguieron: Hormona del crecimiento humana (1983); interferón α y la vacuna recombinante contra la hepatitis B en 1986; tPA en 1987; eritropoyetina (EPO) en 1989; Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF) en 1991; Factor VIII en 1992; e Interferón β en 1993. Dicha lista de productos ha aumentado de tal manera que al día de hoy en la FDA cuenta con alrededor de 200 registros y para el año 2014 el 70% de los medicamentos más vendidos en los Estados Unidos fueron de naturaleza biotecnológica (Tabla 2).

En los últimos diez años las grandes compañías farmacéuticas han acelerado el proceso de adquisición de empresas pioneras en la biotecnología, gracias al éxito obtenido en el desarrollo de productos terapéuticos, lo cual da como origen a las llamadas compañías biofarmacéuticas integrales. (Biogen es de las pocas compañías biotecnológicas independientes que continúan en el mercado). La

experiencia en el desarrollo de productos junto con la inversión al área de Investigación y Desarrollo (R&D) provee las condiciones adecuadas para el rápido crecimiento observado en esta industria. Debido a esto las empresas están trabajando en la obtención de productos que además de proporcionar beneficios a los pacientes sean innovadores. (Soetaert, 2010).

*Tabla 2. Los 10 medicamentos más vendidos basados en ventas mundiales.
© Bloomberg 2015.*

Compañía	Marca	Molécula	Indicación	Ventas 2014 (Millones de dólares)
AbbVie	Humira	Adalimumab (mAb)	Enfermedades autoinmunes: artritis reumatoide, psoriasis crónica en placa, enfermedad de Crohn (en adultos y pediátrica), colitis ulcerosa, artritis psoriásica, espondinitis anquilosante, artritis idiopática juvenil poliarticular	12.543
Gilead	Sovaldi	Sofosbuvir	Hepatitis C	10.283
J&J/ Merck&Co.	Remicade	Infliximab (mAb)	Enfermedades autoinmunes: enfermedad de Crohn (en adultos y pediátrica), colitis ulcerosa (en adultos y pediátrica), artritis reumatoide, psoriasis crónica en placa, artritis psoriásica, espondinitis anquilosante.	9.24
Amgen/Pfizer	Enbrel	Etanercept (proteína de fusión)	Enfermedades autoinmunes: artritis reumatoide, psoriasis crónica en placa, artritis psoriásica, espondinitis anquilosante, artritis idiopática juvenil poliarticular	8.538
Sanofi	Lantus	Insulina glargina (péptido)	Diabetes	8.433
Roche	Rituxan	Rituximab (mAb)	Linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener y poliangitis microscópica.	7.55
Roche	Avastin	Bevacizumab (mAb)	Cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer renal, glioblastoma	7.021
GSK	Advair	Propionato de fluticasona y salmeterol	Asma, EPOC	6.971
Roche	Herceptin	Trastuzumab (mAb)	Cáncer de mama HER2+	6.886
Merck&Co	Januvia	Sitagliptina	Diabetes	6.002

2.2 Medicamentos Convencionales vs Medicamentos Biotecnológicos.

Los medicamentos obtenidos a través de procesos biotecnológicos tienen características que los diferencian de aquellos obtenidos convencionalmente por síntesis química (farmoquímicos)

Los medicamentos biotecnológicos son proteínas o glicoproteínas de alto peso molecular (mayor a 1 kDa) en las que un cambio pequeño en uno o más aminoácidos puede no producir un producto con actividad terapéutica distinta. Mientras que los farmoquímicos son moléculas sencillas de bajo peso molecular, generalmente inferior a 1000 Da, en ellos cualquier modificación química estructural puede alterar dramáticamente su actividad farmacológica permitiendo la aparición de nuevos usos e indicaciones.

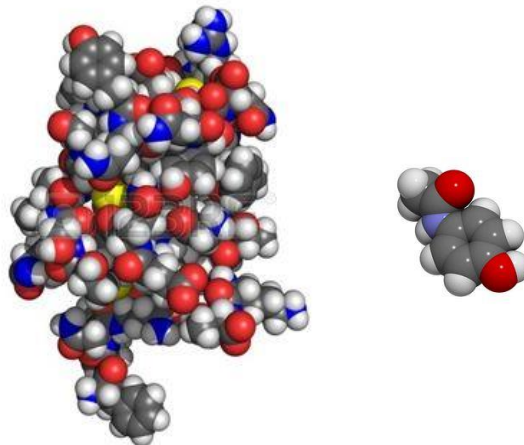


Figura 1. Comparación de tamaño entre una molécula de origen biotecnológico: insulina (izquierda) y una de origen farmoquímico: paracetamol (derecha).

En la caracterización de su estructura tridimensional, los farmoquímicos pueden ser dilucidados fácilmente, mientras que los biotecnológicos dicha determinación es mucho más compleja afectando la pureza proteica alcanzada y la actividad biológica.

En cuanto a su estabilidad química, los biotecnológicos pueden sufrir procesos de oxidación, desaminación, ruptura de puentes disulfuro, hidrólisis, etc que provocan alteraciones que inducen una respuesta inmunológica, lo cual no se aprecia de la misma manera en los farmoquímicos, estos solo pierden la actividad biológica, sin causar reacciones inmunológicas.

Como se puede apreciar, ambos tipos de fármacos poseen diferencias significativas, las cuales deben de considerarse al momento de formular un producto farmacéutico, así como para la elección de la vía de administración.

2.3 Administración de Medicamentos Biotecnológicos.

La vía de administración es la ruta de entrada del fármaco al organismo que influye en la latencia, intensidad y duración del efecto farmacológico. Las vías de administración utilizadas para los productos biotecnológicos no difieren de las de los fármacos convencionales:

- Parenteral: intravenosa, intramuscular y subcutánea.
- Oral
- Bucal
- Ocular
- Transdérmica
- Tópica
- Nasal
- Pulmonar

Pero debido a la naturaleza de los medicamentos de origen biotecnológico deben tomarse otras consideraciones para la elección de dicha vía.

2.3.1 Parenteral.

Las formas farmacéuticas inyectables tienen como objetivo alcanzar una biodisponibilidad completa dentro del cuerpo, además requieren de altos estándares de calidad y deben estar libres de contaminación microbiana. Las rutas sistémicas o parenterales de administración incluyen la intravenosa (IV), subcutánea (SC), intramuscular (IM), intradérmica (ID), intravítrea e intra-arterial (IA). Sin embargo la vía intravítrea, ID e IA tienen aplicaciones limitadas. Actualmente, cerca del 96% de los productos basados en proteínas y péptidos son administrados a los pacientes mediante inyecciones. (Kwok, 2012) (Figura 2).

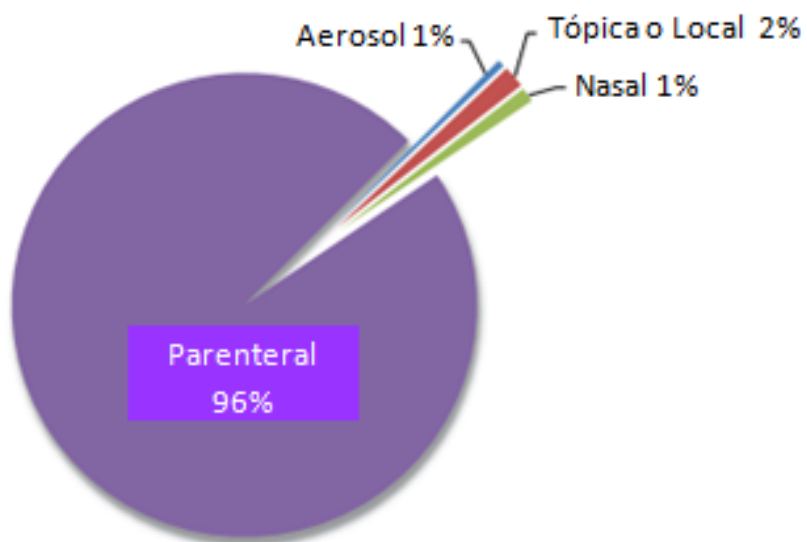


Figura 2. Rutas de Administración de Medicamentos Biotecnológicos
(Modificada de Kwok, 2013)

Además, comparados con otras vías de administración, la IV provee un rápido y predictivo acceso a los tejidos a través de la distribución sanguínea, pero son rápidamente eliminadas del cuerpo mediante proteólisis o excreción metabólica. Para moléculas de bajo a medio peso

molecular (<40-70 kDa), la administración sistémica puede resultar en un tiempo corto de duración de la acción. La mayoría de las proteínas con un peso molecular de 20 – 30 kDa son eliminadas gracias a la filtración renal y no son reabsorbidas, durante el primer paso, a través del riñón. Como resultado, la administración IV de una proteína requiere mayor frecuencia de inyecciones que no es sólo un inconveniente, también incrementa el riesgo de infección, particularmente para niños, ancianos y personas con el sistema inmune deprimido.

Esta situación se ha mejorado mediante el uso de la administración intramuscular y subcutánea que proveen un retraso en la absorción de las proteínas hacia el torrente sanguíneo. Como resultado la frecuencia de administraciones disminuye manteniendo niveles terapéuticos.

2.3.2 Oral.

La vía de administración oral es la preferida y más comúnmente utilizada para fármacos convencionales debido a la facilidad de administración, aceptación del paciente y por su buena absorción intestinal. Para las proteínas terapéuticas no es así, ya que quedan expuestas a altos niveles de proteasas, como la pepsina en el estómago, que inmediatamente inactivan el fármaco. Inclusive con las mejores tecnologías de estabilización, como el recubrimiento entérico, solo una pequeña fracción de la proteína sobrevive a la degradación proteolítica, causada por las enzimas provenientes del páncreas, y es absorbida al torrente sanguíneo. Posteriormente esa pequeña parte, además, es sometida a metabolismo de primer paso por parte del hígado. Por lo tanto, la formulación de péptidos y proteínas para administración oral sigue representando un reto en la actualidad. (Rodney, 2013).

2.3.3 Bucal

Las membranas mucosas de la cavidad oral se encuentran altamente vascularizadas y son relativamente permeables. Los medicamentos diseñados para disolverse debajo de la lengua son ejemplos de formas farmacéuticas bucales, las cuales son ampliamente aceptadas por los pacientes. Entre las características que le permiten a esta vía ser una opción para la administración de medicamentos biotecnológicos, se encuentran que la mucosa en la cavidad oral exhibe una baja actividad de proteasas, comparados con el intestino, y la membrana que funge como barrera es permeable a péptidos con alrededor de 5-10 residuos aminoácidos (*íbidem*). Algunos estudios han reportado el éxito en la liberación de desmopresina para el tratamiento de la diabetes insípida por esta ruta con una forma farmacéutica oral liofilizada (Osterberg et al. 2006).

2.3.4 Ocular.

Menos del 3% de los fármacos tópicos que son aplicados por vía ocular permean al epitelio corneal, alcanzando el humor acuoso y el humor vítreo, para posteriormente continuar su camino hacia la circulación sistémica. Las soluciones que contienen péptidos o proteínas, cuando son aplicadas a nivel oftálmico, activan los mecanismos protectores del ojo como son dilución lagrimal, drenaje, unión de proteínas y degradación enzimática, los cuales trabajan para disminuir la concentración del fármaco y limitar su paso a través del epitelio corneo. (Rodney, 2013). De acuerdo a un estudio (Lee et al 1986) solo una pequeña fracción (<0.1%) de leucina encefalina y su derivado análogo resistente a proteasas alcanzan el humor acuoso como péptidos intactos gracias a los mecanismos anteriormente mencionados. Debido al poco

éxito para la administración de biofármacos utilizando gotas o medicamentos tópicos, se han desarrollado formas farmacéuticas más invasivas como la inyección ocular, que debe ser administrada por profesionales de la salud entrenados. (Rodney, 2013)

2.3.5 Transdérmica y Tópica.

Para efectos locales en la piel, la liberación de péptidos y proteínas puede ser útil. Teóricamente, la vía transdérmica puede proporcionar una velocidad constante de la liberación del fármaco por días y reducir el efecto del metabolismo de primer paso, comparado con la vía oral, ya que los fármacos penetran la epidermis y dermis hasta alcanzar los vasos linfáticos y sanguíneos. Por lo tanto, alcanzan la sangre sin pasar por el hígado, evitando su metabolismo. Sin embargo, la absorción a través de la piel está limitada por el tamaño de las moléculas, si es mayor a 1 kDa es complicado realizarlo inclusive con el uso de promotores de la permeabilidad. En el desarrollo de sistemas de liberación transdérmica para productos de la biotecnología se han encontrado grandes variaciones interindividuales en la absorción a través de la piel. No obstante se está utilizando la técnica de iontoforesis para mejorar la penetración en la piel de los activos de naturaleza proteica. La cual se basa en introducir iones de sustancias activas a través de la piel, gracias a la aplicación de corriente continua de baja intensidad a los tejidos, mediante la colocación de dos electrodos. El fundamento es que las sustancias iónicas poseen carga eléctrica y tienden a desplazarse hacia el polo de signo contrario, donde son absorbidas a través de la piel (*íbidem*).

2.3.6 Nasal

Las proteínas biofarmacéuticas liberadas en la cavidad nasal deben cruzar las células epiteliales de la mucosa (alrededor de 3 mm de grosor) que están cubierta con enzimas degradadoras. La superficie total de la mucosa nasal es alrededor de 200 cm² y la cavidad nasal puede acomodar 1.5 mL de una solución. Gracias a que la cavidad nasal está ricamente vascularizada, y el paso a través de ella evita el efecto de primer paso del hígado, puede ser una ruta atractiva de liberación de proteínas y péptidos pequeños. La liberación intranasal de algunos péptidos con un tamaño menor a 10 aminoácidos ha mostrado una buena biodisponibilidad: 75% somatostatina y 100% metcefamida (Lee, et al. 1994) inclusive la somatostatina se encuentra disponible para estudios clínicos (Rodney, 2013).

Como se puede apreciar, existe una amplia variedad de vías de administración y la elección de alguna de ellas depende del efecto que se quiere alcanzar así como las características de los fármacos a emplear. Sin embargo el resto de ellas, salvo la vía parenteral, presentan dificultades que no han podido ser superadas, haciendo a la primera la mejor elección para la liberación de medicamentos biotecnológicos, pero es necesario el desarrollo de una forma de administración que no incluya los inconvenientes que presenta la vía parenteral, y que además presente ventajas para el médico, el cuidador y el paciente: la vía pulmonar.

Capítulo 3. Administración Pulmonar.

La administración pulmonar se ha convertido en un blanco atractivo y de un gran interés científico y biomédico debido a que el pulmón es capaz de absorber principios activos para deposición local o para liberación sistémica, esto debido a la alta permeabilidad, la gran superficie de absorción de los pulmones (70-140 m² en humanos adultos) y un buen suministro de sangre. Tiene diversas ventajas sobre otros tipos de administración como la baja actividad enzimática, rápida absorción del fármaco y la capacidad de evitar el metabolismo de primer paso. (Ashis, 2012; Choturvedi, 2013; Depreter, 2013; Hertel 2014; Koussoroplis, 2013; Kowk, 2013; Nokhodchi, 2015; Patil, 2012; Shaikh, 2010).

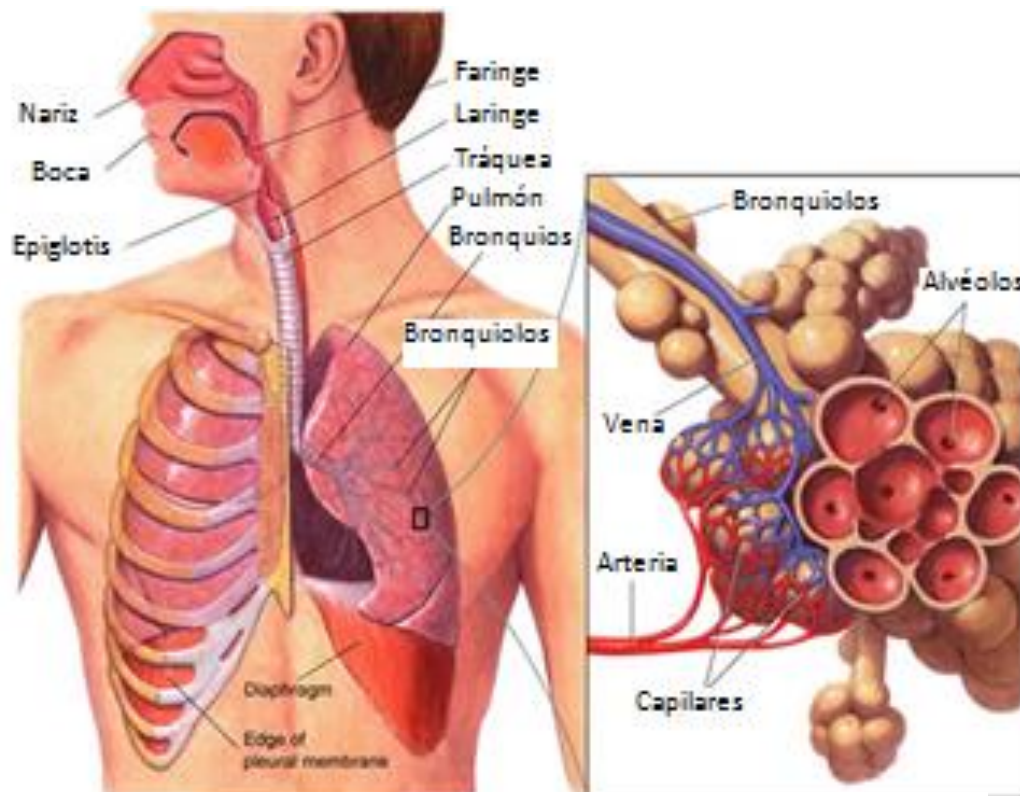


Figura 3. Esquema general del sistema respiratorio. Imagen modificada, extraída de <http://www.goldiesroom.org/Note%20Packets/13%20Human%20Other/00%20Human%20Other%20Systems--WHOLE.htm> el 28Mar16

3.1 Antecedentes.

El uso de la vía de administración pulmonar es una actividad tan antigua como lo son las primeras civilizaciones en el mundo. Los orígenes de la terapia inhalatoria para el asma y otros problemas respiratorios, se encontraron en registros de la medicina Ayurvédica en la India, 2000 a.C., en los que se relata el empleo de preparados herbales de *Datura stramonium* que eran fumados, ya que esta especie contiene ciertos alcaloides anticolinérgicos broncodilatadores. La civilización egipcia alrededor del año 1500 a.C. utilizó la inhalación de vapores de beleño negro que contiene hiosciamina, otro anticolinérgico, en el tratamiento de diversas enfermedades respiratorias. En la medicina moderna, la práctica de la inhalación de sustancias, exceptuando gases medicinales, fue adoptada en la década de 1950 para el tratamiento del asma y ahora es utilizada para el tratamiento de otras enfermedades relacionadas con los pulmones (Anderson, 2005). Recientemente, otros avances han permitido el incremento en el interés en la liberación sistémica de fármacos mediante inhalación. Por esta vía, las moléculas pequeñas presentan una acción rápida, bajo metabolismo y alta biodisponibilidad, mientras que las macromoléculas pueden ser liberadas sin el uso de inyecciones, con un inicio de absorción rápido y farmacocinética favorable, evitando las severas condiciones del tracto gastrointestinal y el efecto del metabolismo de primer paso ejercido por el hígado. (Kowk, 2013).

3.2 Dispositivos para Liberación Pulmonar.

Para la liberación pulmonar los dispositivos juegan un papel equivalente a los aspectos de formulación. Es complicado administrar un medicamento a través de los pulmones sin un dispositivo adecuado. El

desarrollo de estos dispositivos se inicio en 1778 con el médico inglés John Mudge quien fue el primero en utilizar el término "inhalador" al nombrar su invención como *Inhalador Mudge* (Anderson, 2005). Éste consta de una jarra de peltre con una boquilla en la parte superior de la tapa y un mango perforado, de tal manera que cuando el paciente respiraba por la boquilla, el aire era extraído a través de los agujeros en el mango y pasaba a través del líquido en el fondo del recipiente (Figura 4).



Figura 4. Fotografía del Inhalador Mudge.
(Anderson, 2005)

En 1989 Auphon Euget-Les Bain inventó el nebulizador para la industria de las fragancias. En aquella época se acostumbraba la inhalación de aguas termales en los balnearios y en 1958 Jean Sales Girons introdujo el primer nebulizador portable al que denominó *Pulverisateur*, era empleado para los pacientes imposibilitados para asistir a los balnearios. Este nebulizador tenía una bomba manual que extraía líquido desde el reservorio y lo forzaba a pasar a través de un atomizador. (Pineda, 2012)

En 1889 surgió el balón de humo carbónico precursor de los DPIs (Inhaladores de Polvo Seco, por sus siglas en inglés). Este se trataba de un balón de caucho hueco con un tamiz para desagregar el polvo en su interior, al apretar el balón se liberaba el polvo generando un aerosol, con este balón se administraba ácido carbónico y glicirricina (Anderson, 2005).

En la actualidad se encuentran disponibles nuevos métodos de administración de fármacos en aerosol que están descritos a continuación.

3.2.1 Inhaladores de Dosis Medidas (IDM)

En la primera mitad del siglo XX, los fármacos inhalables para el tratamiento del asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica eran administrados mediante nebulizadores manuales. Estos dispositivos eran frágiles y la dosis variaba con la presión que ejercía la mano sobre la válvula. Laboratorios Riker expuso a mediados de los 50's el desarrollo de formulaciones de fármacos broncodilatadores en contenedores presurizados, proporcionando una mayor conveniencia y dosis más confiables (*íbidem*).

El inhalador de dosis medidas (IDM) o MDI (*Metered Dose Inhalers*) se convirtió rápidamente en el dispositivo más importante para el dispensado de fármacos inhalables. Este sistema puede ser definido como una forma farmacéutica presurizada diseñada para la administración de agentes terapéuticos al tracto respiratorio. Consisten en el fármaco micronizado disuelto o suspendido en un sistema propelente, el cual contiene al menos un gas licuado en un contenedor presurizado que es sellado con una válvula dosificadora. La activación de

la válvula libera una dosis del medicamento en la forma de aerosol, el cual es dirigido por un adaptador adecuado para la administración. Cuando el dispositivo es accionado, el propelente queda expuesto a la presión atmosférica, la cual permite la formación del aerosol mediante la expansión del gas. Debido a que viaja a través del aire, el aerosol aumenta su temperatura permitiendo la evaporación del propelente que reduce el tamaño de partícula al rango deseado. La fracción del fármaco que entra a la vía aérea oscila entre 5 – 15%.

Los MDI han sido favorecidos por los pacientes por alrededor de 50 años, debido a que combinan los beneficios de: un tamaño reducido, portabilidad, conveniencia, y es relativamente barato; cuenta con la capacidad multidosis que significa que una dosis se encuentra disponible inmediatamente cuando se requiere el tratamiento; una dosis puede ser liberada en unos cuantos segundos y debido a que el inhalador es presurizado, el contenido es protegido del ingreso de humedad y patógenos.



Figura 5. Inhalador de Dosis Medida (MDI). Extraído de <http://www.nytimes.com/health/guides/disease/chronic-obstructive-pulmonary-disease/medications.html> el 28Mar16

Las limitaciones de estos dispositivos incluyen que la liberación del fármaco depende en gran medida de la técnica de inhalación del paciente, ya que se debe coordinar la acción del dispositivo con la inhalación. Además, algunos pacientes sufren de lo que se conoce como efecto *Freón frío*, en el cual la llegada de propelente a la parte trasera de la garganta causa el cese de la inhalación.

Otro problema es que, aunque con una buena técnica de inhalación, solo se deposita sobre los pulmones entre el 10-20% de la dosis, causando efectos adversos en la orofaringe, como la tos.

Se están realizando mejoras tecnológicas en el dispositivo y a las formulaciones que le permitan continuar con el éxito obtenido a los MDI, no solo en terapias como el asma y EPOC, sino también en las que se encuentran orientadas a acción sistémica.

3.2.2 Inhaladores de Polvo Seco (DPI).

Como alternativa a los MDI, se han desarrollado los inhaladores de polvo seco (DPI, por sus siglas en inglés, *dry powder inhalers*), los cuales no contienen propelentes.

En los DPI, las partículas del fármaco (5 μm) son mezcladas con una cantidad adecuada de acarreador (Ejem: Lactosa), para mejorar las propiedades de flujo y la uniformidad de dosis. El polvo seco es liberado en el pulmón a través del dispositivo. La deaglomeración y aeroionización del polvo en la formulación requiere la generación de turbulencia para romper los aglomerados grandes en partículas más pequeñas, finas e inhalables.

Estos dispositivos operan a ritmos bajos del flujo respiratorio, por lo cual son dispositivos ampliamente aceptados por niños y adultos con un decremento en la función pulmonar.

Entre sus desventajas se encuentran: la fracción del fármaco que llega al sitio de acción varía entre el 9-30%, que depende, además del diseño del producto; la uniformidad de contenido presenta un problema potencial y es más caro que el MDI.

Actualmente existen dos tipos:

Unidosis. Son dispositivos en donde la cápsula que contiene el polvo es colocada en un soporte. Dicha cápsula es abierta dentro del dispositivo y el polvo es inhalado. El residuo de la cápsula debe ser descartado después de usarse e insertar una nueva cápsula para la siguiente dosis.

Multidosis. Utilizan un disco circular que contiene de cuatro a ocho dosis. Esto es típicamente el tratamiento para uno o dos días. Las cuales se mantienen separadas en reservorios de aluminio hasta antes de la inspiración. Utilizan un disco circular que contiene de cuatro a ocho dosis, las cuales se mantienen separadas en reservorios de aluminio hasta antes de la inspiración. Estos dispositivos son utilizados normalmente para un tratamiento de uno o dos días.

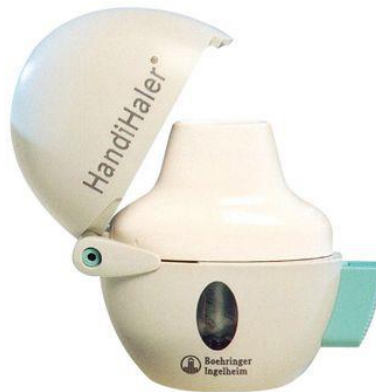


Figura 6. Inhalador de Polvo Seco. Extraído de <https://sites.google.com/site/alvaroportafolio/caso-clinico-n-2/2-situacion-biologica/enfermedades-respiratorias> el 28Mar16

La investigación en DPI incorporará fármacos en una matriz particulada para alcanzar una deposición pulmonar específica y probablemente para alcanzar liberación intracelular, especialmente, proteínas, péptidos, plásmidos, DNA, etc.

3.2.3 Nebulizador

Los nebulizadores son utilizados como soluciones o suspensiones de fármacos aerolizables, particularmente utilizadas en el tratamiento de pacientes hospitalizados. Puede transportar una mayor cantidad de fármacos a los pulmones que MDI o DPI, además de que permiten que la dosis se inhale a la velocidad adecuada durante la respiración normal. La desventaja más común es que el nebulizador tiene un alto costo debido a la necesidad de asistencia de profesionales de la salud.

Hay dos tipos básicos:

Air jet. Una corriente de aire comprimido se hace pasar a presión a través de un orificio, generándose en la zona un área de presión

negativa que hace ascender el líquido con el fármaco contenido en un reservorio (efecto Venturi). La corriente de aire impacta sobre el líquido que asciende produciendo su dispersión en forma de pequeñas gotas (aerosol niebla)

Nebulizador ultrasónico. El aerosol se genera en la cámara nebulizadora mediante un cristal piezoeléctrico que vibra a elevada frecuencia produciendo ondas de ultrasonidos. Éstas generan un aerosol niebla en la superficie de la solución que se encuentra en el generador.

Todos los dispositivos anteriores pueden ser utilizados para administración de medicamentos convencionales con acción local y con acción sistémica.

3.3 Retos en la Formulación de Proteínas Inhalables.

Las proteínas pueden ser sometidas a diversos problemas de integridad durante la producción, formulación y/o almacenamiento. La mayoría de ellas son estructuralmente inestables en solución debido a que pueden ser sujetas a estrés. Esto incluye exposición a elevadas temperaturas o pH extremos, estrés por agitación, adsorción de superficie, estrés por congelamiento, exposición a la luz y la presencia de algunos metales o disolventes orgánicos. Esto puede resultar en degradaciones fisicoquímicas que pueden afectar la estructura de la proteína, posiblemente conduciendo a la pérdida total o parcial de la actividad farmacológica. (Ohtake et al., 2011). Además, las proteínas terapéuticas están sujetas a los mecanismos de eliminación pulmonar *in vivo*, donde enfrentan la eliminación mucociliar o por macrófagos así como la

degradación por peptidasas y proteasas. El tipo y el grado de degradación depende en las características individuales de cada proteína y la estrategia para el mantenimiento de la integridad de cada una de ellas deber ser elegida caso por caso. (Depreter et al., 2013)

3.3.1 Degradación Fisicoquímica.

Las degradaciones físicas más frecuentes que pueden ocurrir en una proteína farmacéutica son la desnaturalización y la agregación no covalente (*íbidem*). La desnaturalización se refiere al despliegue (que puede ser reversible) de la estructura terciaria que puede ser parcial o total, lo cual puede provocar la pérdida de la actividad terapéutica si se afectan las partes funcionales, como lo es la porción que se une al sitio receptor para activar una enzima. Muchos tipos de estrés físico permiten la desnaturalización de una proteína como las bajas temperaturas, los solventes orgánicos, la presencia de aire o agua y altas concentraciones de sales (Chang y Pikal, 2009). Además pueden sufrir reacciones como le desaminación, oxidación, hidrólisis, glicosilación, entre otras causando alteraciones en la estructura de la proteína.

Las proteínas sin plegar pueden ser precursores en la agregación de las mismas. Esto porque dichos intermediarios exponen más sus residuos hidrofóbicos y tienen una mayor flexibilidad que el estado plegado, lo cual conduce a contacto proteína-proteína que interaccionan a través de dichas zonas hidrofóbicas obteniéndose una manera energéticamente más favorable (Wang et al., 2010). Estas interacciones generalmente producen dímeros, trímeros y agregados más extensos, los cuales, en un inicio son solubles pero gradualmente se vuelven insolubles tendiendo a precipitar. (*íbidem*)

Después de la agregación física, las vías de agregación química se llevan a cabo a través del intercambio molecular tiol-disulfuro, la cual puede ocurrir en proteínas que contengan dos grupos tiol libres (residuos de cisteína) y enlaces disulfuro, como la albúmina de suero bovino y la albúmina recombinante humana (Liu et al., 1991; Chang y Pikal, 2009). Durante este proceso, el tiol ionizado de una proteína lleva a cabo un ataque nucleofílico en un enlace disulfuro de otra proteína. Lo que resulta es un nuevo enlace intermolecular con la conservación del ión tiolato. Al igual que los agregados físicos, si se obtiene un gran peso molecular se vuelven insolubles y por ende precipitan.

La desaminación es la degradación química más común en las proteínas que puede significar un gran impacto en la estructura y función (Vlasak et al., 2009). Consiste en la hidrólisis de un lado de la cadena en los residuos de aminoácidos glutamato o asparagina para producir un ácido carboxílico (Chang y Pikal, 2009; Vlasak et al., 2009). Los problemas de estabilidad por desaminación casi siempre involucran a los residuos de asparagina. Dicha reacción es mayormente favorecida en condiciones neutras o alcalinas, con un máximo de estabilidad generalmente ente pH 2 y 5 (Wang, 1999).

Algunos aminoácidos son susceptibles a oxidación en las proteínas recombinantes como la metionina y en un grado menor la cisteína, con la formación de derivados sulfóxidos (Wang, 1999). Comparado con la metionina, el sulfóxido de metionina tiene una cadena lateral más grande, más polar y menos flexible con un decremento de la hidrofobicidad, y un incremento en la capacidad de formar enlaces hidrogeno (Chumsae et al., 2007). Esto puede afectar la estabilidad cambiando la estructura terciaria y secundaria de la proteína, lo cual produce la pérdida de la actividad biológica, incrementando la inmunogenicidad y/o incrementando la agregación (Zang et al., 2012).

Factores como el pH, la naturaleza de los amortiguadores, la presencia de iones metálicos, los agentes quelantes y la exposición a la luz son variables críticas en la oxidación de la metionina para pequeños péptidos y grandes proteínas (Depreter et al., 2013).

Los azúcares son utilizados como estabilizadores de proteínas en formulaciones líquidas y sólidas. Desafortunadamente, los azúcares reductores pueden reaccionar con grupos aminos en proteínas formando aductos, especialmente a altas temperaturas (Wang, 1999). Esto es conocido como la reacción de Maillard o glicación. Ocurre primeramente en las cadenas laterales de la lisina, también puede ocurrir ocasionalmente en las cadenas laterales de arginina, asparagina y glutamina (Li et al., 1996; Quan et al., 2008). Los azúcares reductores incluyen fructosa, maltosa, lactosa, glucosa y xilosa. Si se expone en exceso, los productos glicados pueden producir una clase de compuestos químicos heterogéneos, denominados productos finales de glicación avanzada, que pueden alterar, permanentemente la estructura y la función de la proteína (Sattarahmady et al., 2007)

3.3.2 Estrategias para Superar la Degradación Físicoquímica.

Para superar la degradación físicoquímica se puede hacer uso de la modificación química, el secado de la proteína (liofilización, *spray-drying*, secado con fluido supercrítico) así como adición de excipientes estabilizantes (agentes amortiguadores, surfactantes, azúcares, polioles y aminoácidos) (Depreter et al., 2013).

La ingeniería genética de una proteína recombinante que introduce una o varias sustituciones en su secuencia natural puede afectar

dramáticamente las propiedades de las proteínas como la susceptibilidad a la degradación y estabilidad, así como la tendencia a formar agregados (Szlachcic et al., 2011). La modificación más común es el remplazo de cisteínas libres para prevenir la formación de puentes disulfuro intermoleculares (Depreter et al., 2013). Las formulaciones en las que las cisteínas fueron reemplazadas por residuos de serinas mostraron una biodisponibilidad mejorada, una vida media prolongada y no existe decremento en su actividad biológica (Szlachcic et al., 2011). Alternativamente, algunos métodos pueden ser utilizados para bloquear químicamente los grupos sulfhidrilos libres, lo que dificulta la reacción de intercambio tiol-disulfuro (Liu et al., 1991). Ésta, no es la única manera de influenciar la vida media de una proteína, también puede realizarse una modificación de los contactos electrostáticos, la red de puentes de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas y de van der Waals (Szlachcic et al., 2011).

Por otro lado, las técnicas de secado son comúnmente utilizadas en la manufactura de los productos proteicos que son insuficientemente estables en soluciones acuosas. Esto es porque la mayoría de los mecanismos de degradación mencionados con anterioridad son mediados por agua. Numerosas técnicas pueden ser utilizadas para el secado de proteínas y la obtención de polvos con características deseables, entre las que se encuentran la liofilización, *spray-drying* y secado con fluido súper crítico. Es importante destacar que estas diferentes técnicas inducen diferentes tipos de estrés que pueden comprometer la estabilidad de la proteína (Maltesen y van de Weert, 2008). Con todas ellas, el inconveniente más importante es el estrés por deshidratación. Las proteínas no deben ser secadas exhaustivamente, ya que deben mantener cierto grado de hidratación para que los residuos polares se encuentren en la superficie y evitar la

desnaturalización. (Hsu et al., 1991; Ma et al., 2001; Othake et al., 2011). Las condiciones de secado deben ser seleccionadas cuidadosamente caso por caso.

Liofilización. Es la técnica más comúnmente empleada para la elaboración de formas farmacéuticas parenterales. Recientemente ha sido utilizada para obtener un polvo seco de insulina para inhalación (Afrezza®). El primer paso consiste en enfriar el producto lo suficiente para solidificar la preparación, posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso, sin pasar por el estado líquido (Fig 7). Se puede realizar más de un ciclo congelación-sublimación, dependiendo de la cantidad de agua residual que se desee obtener.

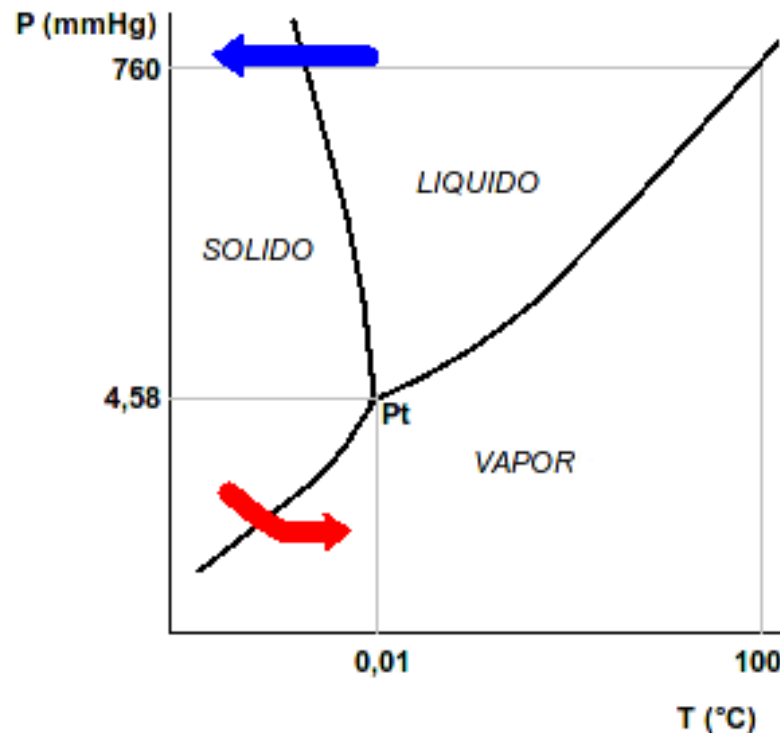


Figura 7. Diagrama de fases del agua, en la que se representa mediante la flecha azul, la congelación del agua, mientras que en la flecha roja se aprecia la obtención de gas sin pasar por el estado líquido.

El proceso de congelamiento, durante la liofilización, es una de las principales fuentes de desnaturalización de las proteínas, debido a que la formación de hielo incrementa la concentración de solutos que, propiciando un aumento en la fuerza iónica, puede generar un cambio en el pH. (Bhatnagar et al., 2007). Además la velocidad del congelamiento afecta la formación de cristales del agua, un congelamiento lento propicia la formación de grandes cristales, mientras que uno rápido promueve la aparición de cristales de menor tamaño con una mayor área superficial específica. Esto resulta en una mayor adsorción de proteínas a la interfase, de este modo incrementa la desnaturalización y formación de agregados (Abdul-Fattah et al., 2007). En contraste, los grandes cristales permiten la formación de grandes poros por donde el vapor puede fluir durante la sublimación. Sin embargo, una velocidad lenta de congelamiento tiende a incrementar la separación de fases entre excipientes y proteínas lo cual las puede desestabilizar (*íbidem*). Por lo que se sugiere que se utilice una velocidad moderada de enfriamiento (alrededor de 1°C/min) lo que permite producir un supercongelamiento moderado con un área superficial del hielo moderada y una velocidad de congelamiento razonablemente rápida (Tang y Pikal, 2004).

Spray drying. Es una técnica utilizada para producir polvos secos, que pueden ser proteínas, especialmente para la administración pulmonar por medio de DPI. Es el proceso que ha recibido la mayor atención para la producción de la formulación de proteínas en DPI debido a su simplicidad, costo-eficiencia y escalabilidad. También permita la ingeniería de partículas con tamaño, forma, propiedades de superficie y densidad definidas, proveyendo características aerodinámicas apropiadas para la inhalación que no puede ser obtenida con otros procesos de manufactura (Sou et al., 2011). El compuesto de interés es

preparado de forma de líquido, como solución o suspensión, y posteriormente es rociado mediante una boquilla en pequeñas gotas. El principio de operación básico está basado en la atomización del líquido dentro de la corriente del gas acarreador. Dicha atomización ocurre debido a la creación de altas fuerzas de fricción sobre la superficie del líquido, causando la desintegración del mismo en gotas (Cal y Sollohub, 2010). Las cuales son secadas por gas caliente y las partículas formadas son separadas del gas por medio de un ciclón, un precipitador electrostático o un filtro (Sou et al. 2011). Los diámetros de las gotas en *spray-dryers* se encuentran en el intervalo que va entre 10 μm (para administración pulmonar) a 100 μm . La producción de gotas causa la formación de amplias áreas superficiales que son expuestas al gas secante. Esto facilita la transferencia de calor del gas secante caliente a las partículas atomizadas, resultando en la evaporación del disolvente en segundos. Como resultado, el material seco nunca alcanza la temperatura de entrada del gas secante, lo que permite que el proceso de *spray-drying* sea útil para el secado de sustancias sensibles al calor como las proteínas (Cal y Sollohub, 2010)

Sin embargo, el proceso de *spray-drying* está asociado con problemas de estabilidad. Además del proceso de deshidratación, existen tres fuentes de estrés durante el proceso de elaboración: calor, agitación y adsorción a la interfase aire-agua durante la atomización (Maltesen y van de Weert, 2008).

Secado con fluido súper crítico (FSC, por sus siglas en inglés). Es una técnica alternativa de secado emergente. Los fluidos supercríticos son aquellos que son utilizados es un rango de temperaturas y presiones por encima de su punto crítico. Esto les permite existir como una sola fase con diversas propiedades ventajosas de las fases líquida y gas: poder de solvatación, viscosidad menor que los líquidos, mayor difusividad de

solutos, entre otras. Para aplicaciones farmacéuticas, la sustancia más comúnmente usada es CO₂ debido a sus bajas temperatura y presión críticas (31.2°C y 7.4 MPa), así como su inflamabilidad, atoxicidad y bajo costo (Shoyele y Cawthorne, 2006). La ingeniería de partículas puede ser obtenida utilizando tres métodos principales. El primero, expansión rápida de solución supercrítica, involucra la disolución del fármaco en el FSC seguido de una expansión rápida a través de un orificio caliente que causa la reducción en la densidad de la solución. Esta reducción disminuye el poder de solvatación del FSC permitiendo la precipitación del fármaco (Pasquali, et al., 2006). La morfología y la distribución del tamaño de las partículas formadas son dependientes de la concentración del soluto en la disolución así como las condiciones en las que se lleva a cabo la expansión (temperatura, presión). Las limitaciones de este método para la elaboración de medicamentos biotecnológicos incluye: las altas temperaturas necesarias para la expansión rápida (más de 40°C), lo cual puede destruir proteínas, y el pobre control sobre el tamaño y la morfología de las partículas. En el segundo método, precipitación de una solución saturada de gas, el FSC es disuelto en un soluto fundido y la solución supercrítica resultante es alimentada, vía un orificio, dentro de una cámara que permite la expansión rápida en condiciones ambiente. (Shoyele y Cawthorne, 2006).

El tercer método, el más común para la elaboración de medicamentos para DPI con proteínas, es la técnica gas antisolvente, el cual usa el FSC como un antisolvente en procesos de cristalización basados en solventes. La alta solubilidad del CO₂ en disolventes orgánicos reduce la densidad de estos últimos y en paralelo su capacidad de solvatación. Lo que causa la nucleación del soluto y la formación de partículas (*íbidem*) Dimetilsulfóxido (DMSO) y N,N-dimetilformamida (DMFA) son los más

comúnmente utilizados ya que satisfacen el criterio de solvatación de proteínas y la solubilidad del CO₂.

Debido a los tipos de estrés que pueden afectar a una proteína durante el secado, es necesario hacer uso de excipientes estabilizantes, que además proveen una mejor estabilidad a largo plazo durante su almacenamiento.

Los estabilizantes abarcan una amplia variedad de moléculas que incluyen sales, surfactantes, azúcares y aminoácidos. En la Tabla 3 se presentan los excipientes más utilizados en formulaciones de proteínas secas.

Tabla 3. Excipientes para la producción de productos con proteínas secas y su efecto estabilizante.

Tipo de Excipiente	Nombre	Mecanismo de estabilización	Status para uso pulmonar
Sales	PBS	Provee un efecto amortiguador durante el congelamiento o secado.	NaCl y buffer de fosfatos aprobado en Flixotide
	HBS		Faltan datos sobre toxicidad en pulmón
	Citrato		Aprobado en Exubera (DPI)
Tensoactivos	Polisorbato 80	Previene desdoblamiento/agregación mediante la exclusión de la proteína de la interfase aire-líquido o hielo/líquido.	Aprobado en formulaciones nebulizadas (Ejem Pulmicort)
	DPPC		Aprobado en pMDIs (Ejem. Combivent, Serevent)
	Glicolato de sodio		Falta de datos suficientes de toxicidad en pulmón, se sospecha que causa inflamación aguda a altas concentraciones.
Poliolés	Manitol		Aprobado en Exubera (DPI)
	Sorbitol		
Azúcares no reductores	Trealosa	Formación de una matriz vidriosa (movilidad molecular reducida) y/o efecto de reemplazo de agua (puentes de H de la proteína con los grupos hidroxilo del estabilizador)	Falta de datos de toxicidad en pulmón.
	Sucrosa		
	Inulina		
	Dextran		

Tabla 3. Excipiente para la producción de productos con proteínas secas y su efecto estabilizante (Continuación)

Tipo de Excipiente	Nombre	Mecanismo de estabilización	Status para uso pulmonar
Azúcares reductores	Fructosa		
	Glucosa		Aprobado en Bronchodual
	Lactosa		Aprobado y comúnmente utilizado
	Maltodextrina		
	Maltosa		
Amino ácidos	Histidina	Efecto de reemplazo de agua	Falta de información en toxicidad de pulmón
	Arginina		
	Alanina		
	Isoleucina		
	Trileucina		
	Glicina		Aprobado en Exubera (DPI)

Es importante mencionar que solo algunos de ellos han sido aprobados por la FDA debido a la falta de estudios de toxicidad con excipientes inhalados. Actualmente, los únicos excipientes aceptados para inhalación son azúcares (lactosa, manitol y glucosa). Además debe notarse que otros excipientes son aceptados, en menores proporciones, como el estearato de magnesio, agentes amortiguadores y de ajuste de pH (NaCl, HCl, citrato de Na, fosfato de Na, ácido cítrico, ácido tartárico, y trometamol), tensoactivos (ésteres de sorbitán, polisorbatos, ácido oleico, y lecitina de soya) y conservadores (cloruro de benzalconio, ácido etilendiaminotetraacético o EDTA, y parabenos) (Pilcer y Amighi, 2010). Sin embargo, estos son aceptados para el uso en formulaciones líquidas en nebulizadores o MDI y algunos no pueden ser utilizados en DPI debido a su bajo punto de fusión o su estado semisólido o líquido.

3.4 Factores que afectan la disponibilidad de compuestos de naturaleza peptídica administrados por vía pulmonar.

Para que la administración pulmonar de péptidos y proteínas pueda llevarse a cabo, se deben considerar diversos factores fisiológicos que afectan su disponibilidad para alcanzar el efecto terapéutico deseado, los cuales se enlistan a continuación:

- La deposición en el tracto respiratorio
- El aclaramiento mucociliar
- Los macrófagos alveolares
- La actividad de proteasas y peptidasas.
- Los mecanismos de absorción en los pulmones.

3.4.1 Deposición en el Tracto Respiratorio.

La deposición es el proceso que determina la fracción de las partículas inhaladas que serán retenidas en el tracto respiratorio y no serán exhaladas. El diámetro aerodinámico d_{aer} de una partícula inhalada tiene un gran impacto en el sitio de deposición dentro de los pulmones. El d_{aer} es el diámetro de una partícula esférica con una densidad de 1 g/cm³ (ρ_0) que tiene la misma velocidad que la partícula de interés en aire inmóvil. Está definido por la siguiente ecuación:

$$d_{aer} = d \sqrt{\frac{\rho}{\rho_0 \chi}}$$

Donde d es el diámetro geométrico de la partícula, ρ es la densidad de la partícula, y χ es el factor de forma dinámica de la partícula.

La deposición de las partículas en los pulmones ocurre por tres mecanismos principales: impacto inercial, asentamiento gravitacional y

difusión browniana. Esto depende del tamaño de partícula aerodinámico, del flujo de inhalación, y de la anatomía del pulmón. Partículas grandes ($d_{aer} > 5\mu\text{m}$) son depositadas en vías superiores (zona de conducción: boca, tráquea y bronquio principal) mediante impacto inercial, donde la velocidad de la corriente de aire es máxima. La inercia se refiere a la incapacidad de las partículas inhaladas a seguir cambios en la velocidad y dirección del aire inspirado dentro del tracto respiratorio. Por lo que las partículas mantienen su dirección, impactando contra el muro de la vía aérea. Partículas más pequeñas ($d_{aer}= 1-5 \mu\text{m}$) normalmente atraviesan las vías aéreas superiores hasta alcanzar el fondo del pulmón (vías inferiores y bronquiolos respiratorios), donde se depositan mediante asentamiento gravitacional. En esta región, la velocidad del aire disminuye considerablemente debido al incremento de área entrecruzada de tal manera que las partículas caen por efecto de la gravedad. Las partículas más pequeñas ($d_{aer}<1 \mu\text{m}$) permanecen suspendidas en el aire y cerca del 80% son exhaladas debido a su baja inercia y su baja sedimentación.

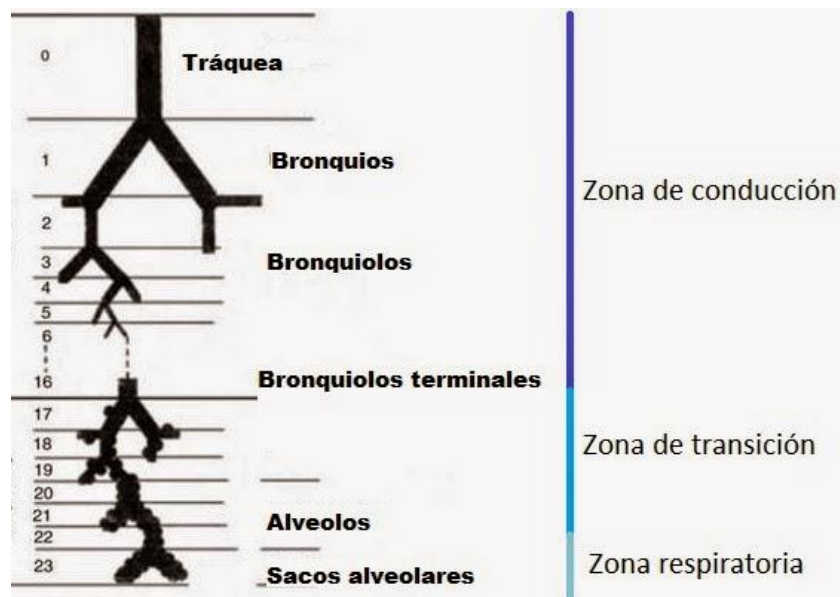


Figura 8. Esquemmatización del árbol bronquial.

Los dispositivos inhaladores generan partículas con un d_{aer} en el rango de micras para deposición en el árbol traqueobronquial (3-10) para el tratamiento de las vías aéreas o en la región alveolar (1-3 μm) para absorción sistémica. (Koussoroplis et al., 2013)

3.4.2 Aclaramiento Mucociliar.

La región de intercambio de gases empieza con la primera generación de bronquiolos respiratorios hasta la pared pulmonar que está formada completamente por alveolos (septo intralveolar). En promedio un pulmón humano adulto consta de 300 millones de alveolos. El septo intralveolar contiene una amplia red de capilares sanguíneos que están rodeados por células endoteliales planas, además, de diversos tipos celulares (Ver Figura 9): Neumocitos tipo I, Neumocitos tipo II, células de Goblet y macrófagos alveolares principalmente.

El neumocito tipo I es una célula escamosa que cubre alrededor de 95% de la superficie del pulmón. Forma, en colaboración con las células endoteliales, la delgada barrera aire-sangre para el intercambio de gases.

El neumocito tipo II es una célula cuboidal que cubre el resto de la superficie. Su principal función es secretar el surfactante pulmonar que previene el colapso de los espacios alveolares. Este está compuesto de 80% fosfolípidos, 5-10% lípidos neutros (colesterol principalmente) 5-6% proteínas surfactantes y 3-4% proteínas no específicas (Perez-Gil, 2008). Los fosfolípidos son responsables de formar una superficie activa en la interfaz aire-líquido. La mitad de estos están compuestos de especies insaturadas como el dipalmitoilfosfatidilcolina. Las proteínas surfactantes incluyen SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. SP-A y SP-D son

hidrofílicas, mientras que SP-B y SP-C son hidrofóbicas. SP-A es capaz de unir múltiples ligandos incluyendo aquellos con los que cuentan algunos patógenos en su superficie, además es recocida por macrófagos alveolares favoreciendo la fagocitosis. SP-B es requerido para la biogénesis del surfactante pulmonar. SP-B y SP-C promueven la transferencia de fosfolípidos en las interfaces aire-líquido.

El moco que recubre las vías aéreas es secretado por las células de Goblet y las células glandulares submucosas formando una capa, con consistencia similar a un gel, compuesta principalmente por agua (95%), mucina (2%), sales, proteínas y lípidos. (Bansil & Tuner, 2006)

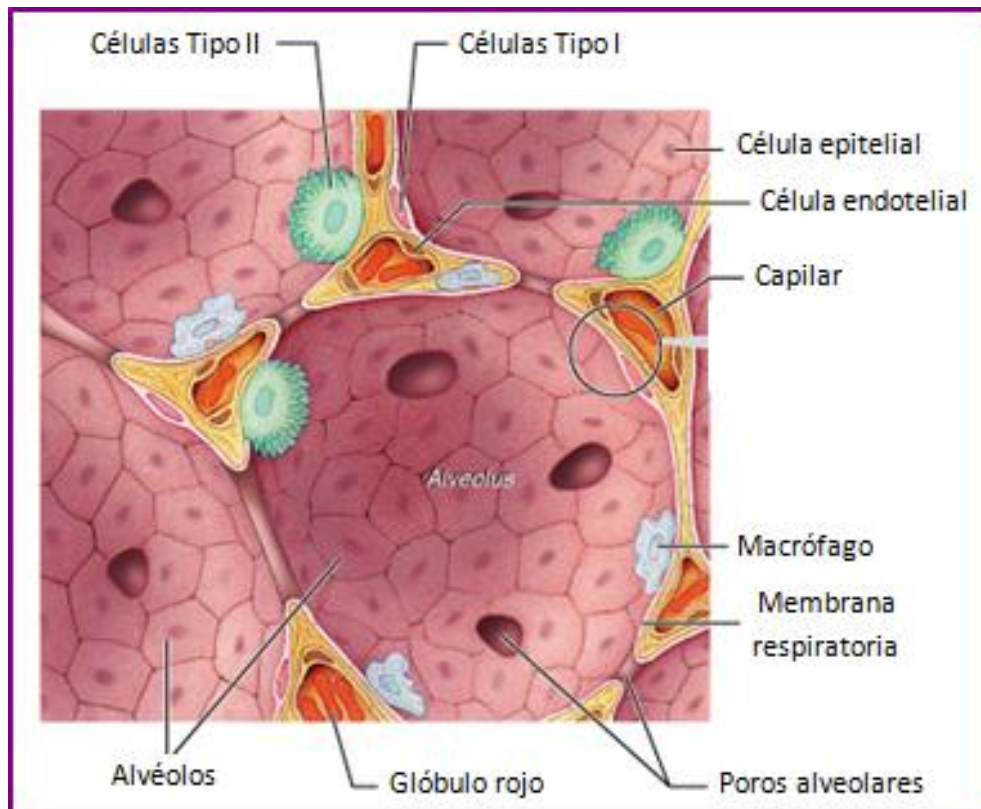


Figura 9. Superficie alveolar. Extraída y modificada de <http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/Anatomy%20&%20Physiology/2020/2020%20Exam%20Reviews/Exam%203/CH22%20Alveoli.htm> el día 28Mar16

El aclaramiento mucociliar elimina proteínas que se adhieren a las fibras de mucina o que se encuentran libremente difusas en el moco pero son incapaces de cruzar el epitelio alveolar. La mucina forma una red con una apertura entre 20 nm y 800 nm, la cual es mucho mayor al diámetro hidrodinámico de la mayoría de las proteínas globulares (2-15 nm) (Olmsted et al., 2001). Sin embargo, algunas de ellas puede presentar enlaces de baja afinidad con la mucina y se dificulta la difusión a través del moco. Las células ciliadas provocan la propulsión de éste hacia arriba y fuera del pulmón, para que pueda ser limpiado de sustancias extrañas.

3.4.3 Macrófagos Alveolares.

Los macrófagos alveolares son una barrera primaria para el transporte de proteínas de gran tamaño del lumen alveolar al torrente sanguíneo (Lombry et al., 1991). Estas proteínas son transportadas lentamente a través de la barrera alveolo-capilar y pueden permanecer por varias horas dentro de los espacios aéreos. Esto permite a los macrófagos fagocitarlas mediante pinocitosis (Koussoroplis et al., 2013).

Existen otros mecanismos que pueden afectar la velocidad de transporte de proteínas a través del epitelio. Por ejemplo, existe evidencia de que ciertas moléculas endógenas que normalmente se encuentran en los fluidos pulmonares, como la albúmina, inmunoglobulinas y transferrina cuentan con transportadores específicos mediados por receptor, que incrementan la velocidad de absorción de estas proteínas (Patton JS et al., 2004). Además, la velocidad de endocitosis, por los macrófagos alveolares, puede ser afectada por las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, siendo así la hidrofobicidad y la carga catiónica global

factores que aumentan dicho mecanismo de eliminación (Ducreux & Vanbever, 2007).

3.4.4 Actividad de Peptidasas y Proteasas.

Aunque los pulmones presentan un ambiente metabólico considerablemente menos hostil que el tracto gastrointestinal, enzimas proteolíticas se encuentran presentes. La degradación enzimática se puede dar antes o durante el transporte de las proteínas.

Las proteínas pequeñas son propensas a ser degradadas por las peptidasas localizadas en la superficie apical de las células de la vía aérea y el epitelio alveolar. La protección de los grupos aminos de los péptidos puede inhibir la acción de la peptidasa, permitiendo el incremento de la biodisponibilidad de la molécula.

Las proteínas grandes no son buenos sustratos como las proteínas pequeñas para las enzimas proteolíticas. Su gran tamaño y estructura globular puede prevenir el acceso al sitio catalítico de las enzimas. El transporte mediante la endocitosis no específica a través del epitelio pulmonar puede provocar su degradación parcial en el compartimento lisosomal. La conjugación de polietilenglicol (PEG) a las proteínas y péptidos puede incrementar la estabilidad proteolítica actuando como blindaje contra las enzimas proteolíticas. Se ha encontrado que los conjugados con PEG tienen de 10 a 20 veces más resistencia comparadas con las versiones no modificadas (Newman, 2005).

3.4.5 Mecanismos de Absorción en los Pulmones.

Ha sido reportado que el epitelio pulmonar es un gran solubilizador para un amplio rango de tipos de fármacos. Los compuestos lipofílicos y no ionizados son transportados a través del epitelio respiratorio al torrente sanguíneo más rápidamente y en mayores cantidades que los compuestos hidrofílicos. Además, la velocidad de transporte de las macromoléculas del lumen del conducto respiratorio a la circulación sistémica depende del peso molecular, aquellas que cuenta con un peso molecular por encima de 40kDa son absorbidas después de varias horas, en contraste con los péptidos y proteínas pequeñas los cuales alcanzan el torrente sanguíneo en pocos minutos después de su inhalación.

Los mecanismos de transporte a través del epitelio respiratorio depende de las propiedades físicoquímicas y biológicas de los fármacos. Las macromoléculas pueden ser transportadas mediante transcitosis mediada por receptor, por difusión paracelular cuando se trata de moléculas con un peso molecular menor a 40 kDa y cuando presentan un tamaño mayor a 40 kDa mediante pinocitosis no específica (Bur M et al., 2006; Kim K & Malik A, 2003).

La transcitosis mediada por receptor es un conjunto de procesos que permiten el paso de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro mediante la formación de vesículas. Involucra la endocitosis y la exocitosis. El transporte paracelular se refiere a la transferencia de sustancias a través del epitelio pasando por el espacio intercelular. Mientras que la pinocitosis es un tipo de endocitosis que consiste en la captación del material del espacio extracelular por invaginación de la membrana citoplasmática, donde dicha vesícula contiene líquido con pequeñas moléculas disueltas o partículas sólidas en suspensión (Figura 10).

3.5 Mercado Actual de los Medicamentos Biotecnológicos para Administración Pulmonar.

En la actualidad hay alrededor de 200 proteínas terapéuticas en el mercado, de las cuales alrededor del 10% han sido diseñadas de acuerdo a su farmacocinética (Thieman & Palladino, 2010). De manera paralela, el hecho de que algunos productos biológicos basados en proteínas estén expirando sus patentes en los próximos años abre la oportunidad de buscar nuevos productos o formulaciones que puedan ser patentadas, lo que ha llevado a la industria farmacéutica a enfocarse en desarrollo de productos (Ho & Gibaldi, 2013; Martin-Moe et al., 2011).

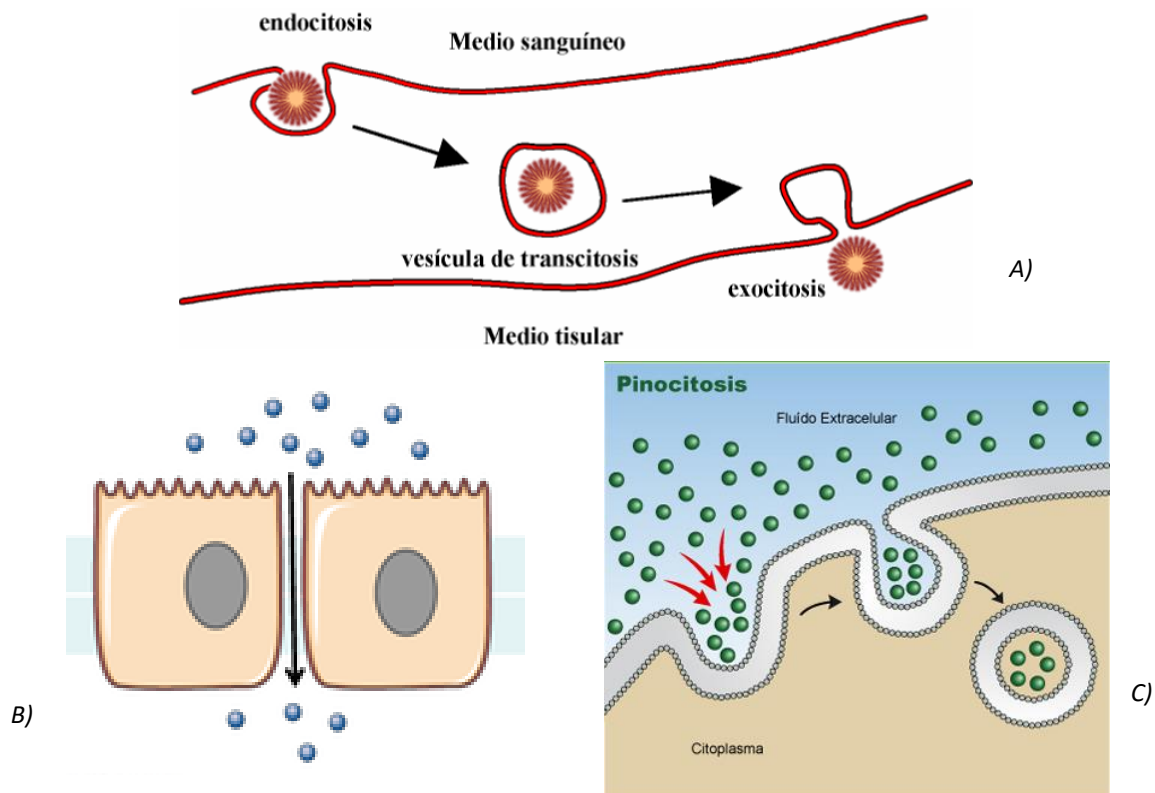


Figura 10. Ejemplificación de los tres principales transporte para la absorción pulmonar. A) Transcitosis B) Transporte Paracelular C) Pinocitosis

La ruta respiratoria ofrece una alternativa no invasiva para el tratamiento de enfermedades pulmonares, así como para la administración sistémica de medicamentos debido a que la absorción es rápida y el metabolismo hepático de primer paso es evitado. Los péptidos y las proteínas son absorbidos de manera más eficiente por los pulmones que por otra vía de administración de medicamentos no invasiva.

3.5.1 Administración Local

La justificación más obvia de la liberación pulmonar es para administrar fármacos para enfermedades que atañen a los pulmones, ya que si son administradas por otras vías, como oral o parenteral, se requieren dosis más altas para alcanzar una efectividad aceptable. Lo cual puede provocar una mayor incidencia de efectos adversos. Estas enfermedades y su tratamiento están descritas a continuación:

3.5.1.1 Asma

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por obstrucción reversible de vías aéreas y broncospasmo. Algunos síntomas incluyen sibilancias, tos, rigidez en el pecho y falta de aliento. Se piensa que es causado por una combinación de factores genéticos y ambientales. (British Guideline on the Management of Asthma, 2014)

Para su tratamiento se recomienda el uso de corticoesteroides para niños y adultos. La primera elección como tratamiento adicional a corticoesteroides inhalables en adultos y niños (5-12 años) es el uso de agonistas beta dos de acción prolongada inhalables. En el caso de los

niños menores de 5 años es el uso de antagonistas de receptores de leucotrienos (*ibidem*)

Avances recientes en el conocimiento de la patobiología del asma sugiere que las terapias biológicas que tienen como blanco las citocinas pueden ser potencialmente útiles para el tratamiento de esta compleja y heterogénea enfermedad de las vías respiratorias. El uso de biológicos en asma ha sido establecido con la aprobación del anticuerpo monoclonal humanizado omalizumab (Xolair; Genentech/Novartis) como tratamiento adicional para la enfermedad que no se ha controlado de manera adecuada. Este medicamento se encuentra en forma de polvo liofilizado con un disolvente para solución inyectable y como lo indica la tabla 4 se realizan estudios clínicos para su administración por vía pulmonar (Fahy et al., 1999).

Además se está acumulando evidencia de soporte de la eficacia de otros biológicos (Ver Tabla 4).

Tabla 4. Terapias biológicas para el tratamiento del asma y su status. (Datos extraídos de Depreter et al., 2013).

Péptido/Proteína	Funciones Biológicas	Compañía líder	Estatus
Omalizumab (anti-IgE)	Inhibición de mastocitos y activación de basófilos	Genentech Inc.	Fase II
Receptor IL-4 (subunidad α recombinante)	Supresión de la actividad de la IL-4 y la IL-13	Immunex Corp NIAID	Fase II Fase II
Muteína IL-4	Antagonista IL-4 e IL-13	Aerovance	Fase II
Ciclosporina A	Inmunosupresión	Aventis Pharmaceutical	Fase I

3.5.1.2 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por un bloqueo persistente del flujo de aire. Se trata de una enfermedad mortal que altera la respiración normal y no es totalmente reversible. Incluye síntomas como disnea (falta de aire), la expectoración anormal y la tos crónica.

El manejo farmacológico estándar, actualmente para la EPOC, el cual incluye broncodilatadores de acción corta y prolongada, y corticoesteroides inhalables, está dirigido a reducir los síntomas y mejorar la función pulmonar pero no cuentan con actividad antiinflamatoria y fallan en el efecto de la progresión de la enfermedad. Los agonistas β_2 de acción prolongada y antagonistas muscarínicos son broncodilatadores en pacientes con esta enfermedad. Cuando son administrados juntos, el incremento en la función pulmonar es significativamente mayor que el de su uso individual.

La terapia farmacológica es utilizada para reducir los síntomas, reducir la frecuencia y la severidad de las exacerbaciones, y mejorar el status de salud y la tolerancia al ejercicio. Se utilizan broncodilatadores, inhalados preferentemente, como los agonistas β_2 , anticonolinérgicos y teofilina. El uso de corticoesteroides inhalados mejora los síntomas, la función pulmonar y la calidad de vida, y reduce la frecuencia de exacerbaciones. Recientemente se está utilizando el roflumilast (administración oral) un inhibidor de la fosfodiesterasa 4, que reduce las exacerbaciones.

La empresa ProtAffin AG, una compañía biotecnológica ha desarrollado una tecnología denominada CellJammer, la cual permite el desarrollo de una nueva clase productos biofarmacéuticos, entre los que se encuentran las proteínas señuelo de unión a glicano para el tratamiento

de enfermedades respiratorias como la EPOC, a inicios del 2012 este producto se encontraba en la fase I de los estudios clínicos.

Mientras que la Universidad de Pittsburg cuenta con un producto que contiene Ciclosporina A, y se encuentra en Fase I de ensayos clínicos para el tratamiento de la EPOC (Depreter, 2013).

3.5.1.3 Hipertensión Pulmonar Arterial (HPA)

La hipertensión pulmonar arterial es un desorden patofisiológico que involucra múltiples condiciones clínicas. La enfermedad se caracteriza por un aumento en la resistencia al flujo sanguíneo a través de la arteria pulmonar, y su diagnóstico se sustenta característicamente al detectar una presión pulmonar arterial media de 25 mmHg o mayor.

El tratamiento se fundamente en contrarrestar los efectos derivados de la patología del propio lecho vascular pulmonar que ocasiona una elevación de la resistencia vascular pulmonar y alteraciones funcionales y morfológicas del ventrículo derecho inicialmente, mientras que en etapas avanzadas se alteran los ventrículos derecho e izquierdo. El tratamiento farmacológico incluye, como primera línea, vasodilatadores del tipo antagonistas del calcio y más recientemente los derivados de la prostaciclina, óxido nítrico y antagonistas de los receptores de la endotelina, en donde la mayoría son administrados por vía oral (Guía de Práctica Clínica, Secretaría de Salud, México, 2010).

La regulación a la baja del péptido vasoactivo intestinal (VIP) puede jugar un rol patogénico en la HAP. VIP es un vasodilatador pulmonar, un inhibidor de la proliferación de células vasculares del músculo liso, y un inhibidor de la agregación plaquetaria (Maruno et al., 1995; Cox et al., 1984). La disminución en la concentración de VIP ha sido reportada en

suero y pulmón de pacientes con HAP (Petkov et al., 2003). Aciptadil es una versión sintética de VIP, ha sido utilizado en forma inhalable en un estudio pequeño en humanos para probar los efectos agudos en la hemodinamia y los gases sanguíneos, y la seguridad de una sola dosis (Leuchte et al., 2008). El aerosol de aciptadil causó una pequeña y temporal, pero significativa, vasodilatación pulmonar selectiva. Sin embargo se requieren estudios para evaluar el potencial terapéutico de aciptadil aerosol, incluyendo dosis mayores y tratamiento crónico. (Raja & Raja, 2011).

Otro péptido vasodilatador es el adrenomedullin, el cual es un péptido endógeno que se piensa, juega un papel importante en la regulación del tono vascular pulmonar (Ichiki et al., 1994; Owji et al., 1995; Kakishita et al., 1999). Recientemente, estudios experimentales han mostrado que la administración exógena de éste péptido induce vasodilatación pulmonar en ratas y gatos (Nossaman et al., 1996, 1995). Además, la inhalación de un aerosol de adrenomedullin ha mostrado que tiene efectos benéficos en la hemodinamia pulmonar sin causar hipotensión sistémica (Nagaya et al., 2000). Aunque aún se necesita realizar un estudio aleatorio multicéntrico controlado para verificar la seguridad y eficacia de adrenomedullin (Raja & Raja, 2011).

Se espera que con el incremento en el entendimiento de la patología de la enfermedad las alternativas terapéuticas continúen en desarrollo y puedan ser utilizadas en combinación para obtener beneficios sintomáticos y de supervivencia para los individuos que padecen esta progresiva y fatal enfermedad.

3.5.1.4 Fibrosis Quística.

La fibrosis quística es una enfermedad genética que afecta a los pulmones, principalmente, provocando la acumulación de moco espeso y pegajoso en dichos órganos.

No existe ningún tratamiento curativo, sin embargo son posibles tratamientos que permiten la mejora de los síntomas y alargar la esperanza de vida. En casos severos, se necesita un trasplante de pulmón. Los medicamentos para el tratamiento de la fibrosis quística que incluyen proteínas de origen biotecnológico que existen hoy en día se encuentran enlistados en la Tabla 5.

Tabla 5. Medicamentos biotecnológicos para el tratamiento de fibrosis quística administrados por vía pulmonar (Datos extraídos de Depreter et al., 2013).

Péptido/Proteína	Nombre comercial	Funciones Biológicas	Compañía líder	Estatus
DNasa	Pulmozyme	Viscosidad del esputo	Genentech/Elly lilly	Aprobada
Antitripsina $\alpha 1$		Inhibición de la tripsina	Rabin MC CSL Behring	Fase II Fase I
IFN gama			NY Univ School of Medicine	Fase I/II

Pulmozyme® es el nombre comercial para la α -dornasa o DNasa que está indicada para mejorar el funcionamiento pulmonar de pacientes con fibrosis quística (FQ), que tengan una capacidad vital forzada (CVF) mayor de 40% de la teórica (Ficha Técnica del Producto). La α -dornasa humana recombinante escinde el DNA extracelular. El esputo de los pacientes afectados con FQ contiene una cantidad abundante de glicoproteínas del moco y ADN extracelular (aproximadamente 6 mg/mL) que procede fundamentalmente de los neutrófilos degenerados

que se acumulan en la vía aérea en respuesta a las infecciones. Se cree que el ADN es el principal factor responsable de las anomalías viscoelásticas del esputo. Se administra en forma de aerosol mediante inhalación. No presenta una absorción sistémica significativa, demostrado por el hecho de que no hay aumento considerable de la concentración de esta proteína en suero humano, ya que se encuentra normalmente en dicho fluido (Ficha Técnica del Producto).

La antitripsina alfa 1 (α 1-AT) es un inhibidor de proteasas que protege tejidos de enzimas de células inflamatorias, especialmente la elastasa de los neutrófilos. En su ausencia, la elastasa de los neutrófilos es libre de romper la elastina, lo cual contribuye a la elasticidad de los pulmones, conduciendo al aumento de las lesiones pulmonares en los pacientes con FQ. La disponibilidad de la administración exógena de la α 1-AT permite una nueva esperanza terapéutica en los pacientes afectados con FQ, así como en los pacientes con deficiencia hereditaria de α 1-AT (Calvete et al., 1996).

El interferón gamma (IFN γ) es una citosina dimerizada producida por los linfocitos T y las natural killer (NK) cuya función más importante es la activación de macrófagos, tanto en las respuestas inmunitarias innatas como las respuestas celulares adaptativas, previamente interviene en el reclutamiento de monocitos de la circulación. Se han realizado estudios para el tratamiento de fibrosis quística, pero se ha encontrado falta de eficacia (Moss et al., 2003), esto puede estar relacionado a las bajas dosis liberadas (Condos et al., 2004).

3.5.1.5 Síndrome de dificultad respiratoria (SDR) neonatal.

El síndrome de dificultad respiratoria (SDR) es un cuadro respiratorio agudo que afecta casi exclusivamente a los recién nacidos pretérmino (RPN). La inmadurez del pulmón del pretérmino no es solamente bioquímica, por déficit de surfactante pulmonar, sino también morfológica y funcional, ya que el desarrollo pulmonar aún no se ha completado en niños inmaduros. El pulmón con déficit de surfactante es incapaz de mantener una aireación y un intercambio gaseoso adecuados. Los síntomas empiezan con dificultad respiratoria y cianosis secundaria por anomalías del intercambio gaseoso. (López de Heredia & Valls, 2008).

El tratamiento de esta enfermedad está encaminado a conseguir una buena función pulmonar y un adecuado intercambio gaseoso, evitando complicaciones como el enfisema intersticial, el neumotórax y la enfermedad pulmonar crónica (*íbidem*) (Tabla 6).

Tabla 6. Medicamentos utilizados para el tratamiento de SDR derivados de la biotecnología administrados por vía pulmonar. (Datos extraídos de Koussoroplis & Vanbever, 2013).

Péptido/Proteína	Nombre comercial	Funciones Biológicas	Compañía líder	Estatus
Surfactante natural que contiene SP-B y SP-C (bovino)	Survanta	SDR neonatal	Abbot Laboratories	En el mercado desde 1991
Surfactante natural que contiene SP-B y SP-C (porcino)	Curosurf	SDR neonatal	Chiesi Farmaceutici S.P.A.	En el mercado desde 1992
Surfactante natural que contiene SP-B y SP-C (bovino)	Infasurf	SDR neonatal	ONY Inc.	En el mercado desde 1999

Los medicamentos enlistados anteriormente constan de fosfolípidos de pulmón, pero en el caso de Survanta® e Infasurf® son de origen bovino, mientras que Curosurf® es de origen porcino. Están indicados para la prevención y el tratamiento rescate del síndrome de dificultad respiratoria (SDR). Reduce la incidencia del SDR, la mortalidad por SDR y las complicaciones debidas a la fuga de aire. Contienen principalmente dos proteínas, SP-B y SP-C, hidrofóbicas, de bajo peso molecular asociados al surfactante humano. El surfactante pulmonar endógeno disminuye la tensión superficial de las superficies alveolares durante la respiración y estabiliza los alvéolos contra su colapso a presiones transpulmonares en reposo. Se administran directamente, por vía intrataraqueal al órgano blanco, los pulmones, donde ocurren los efectos biofísicos en la superficie alveolar. La mayor parte de la dosis se fija en los pulmones en horas después de su administración y los lípidos entran en las vías de reutilización y reciclaje del surfactante endógeno. (Fichas de técnicas de los productos Survanta®, Infasurf® y Curosurf®)

3.5.2 Administración Sistémica

La liberación sistémica de proteínas mediante inhalación provee una alternativa a la administración parenteral debido a la gran superficie alveolar, la baja adhesividad al epitelio, la alta perfusión sanguínea y que se evita el metabolismo de primer paso por el hígado. Además, la administración pulmonar generalmente permite una mayor biodisponibilidad de los fármacos de naturaleza proteica en comparación con otros sistemas de administración (Ashis, 2012; Choturvedi, 2013; Depreter, 2013; Hertel 2014; Koussoroplis, 2013; Kowk, 2013; Nokhodchi, 2015; Patil, 2012; Shaikh, 2010).

Aunque los esfuerzos realizados en el campo de la liberación pulmonar de péptidos y proteínas con alcance sistémico ha sido enorme, existe solo una molécula disponible en el mercado, pero un número considerable de fármacos se encuentran en desarrollo clínico. (Tabla 7)

Tabla 7. Estatus de medicamentos administrados por vía pulmonar con efecto sistémico. (Datos extraídos de Depreter et al., 2013)

Péptido/Proteína	Nombre comercial	Funciones Biológicas	Compañía líder	Estatus
GLP-1		Efecto hipoglicémico	MannKind	Fase I completa
Calcitonina		Metabolismo mineral del hueso	Dura Pharm	Fase I completa
PTH		Metabolismo mineral del hueso		Preclínica
hGH		Crecimiento del hueso	Alkermes/ELi Lilly	Fase I completa
EPO-Fc		Producción de Eritrocitos	Syntonix Pharm/Boehringer Ingelheim	Fase I completa
Insulina	Exubera	Efecto hipoglicémico	Nektar/Pfzer	Aprobada/descontinuada
	AIR system		Alkermes/Eli Lilly	Fase III descontinuada
	Afrezza		MannKind	Aprobada
	AERx IDMS		Aradigm	Fase III descontinuada

El GLP-1 (glucagon like peptide 1) o péptido parecido al glucagón 1 es una hormona que se encuentra bajo investigación para el tratamiento de la Diabetes. GLP-1 estimula la liberación de insulina de las células beta pancreáticas a través del receptor del GLP1 acoplado a proteína G solo cuando los niveles de glucosa se encuentran altos (Thorens et al.,

1993). También suprime la liberación de glucagón del páncreas y disminuye el vaciamiento gástrico, permitiendo la saciedad. En un estudio de prueba de concepto, un derivado de GLP-1 en un sistema DPI (Technosphere™ micropartículas) fue utilizada para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II. El GLP-1 produce niveles de plasma comparables a la administración parenteral y suficiente para inducir la secreción de insulina resultando en la atenuación de la glucosa postalimentos (Marino et al., 2010).

La calcitonina es una hormona polipeptídica que es producida por las células parafoliculares en la tiroides humana que actúa en la reducción de calcio en sangre. La PTH, parathormona u hormona paratiroidea es un polipéptido secretado por las células jefe de las células de la hormona paratiroidea que actúa en el incremento de la concentración del ión calcio. Las administraciones parenterales de calcitonina y PTH han sido utilizadas solas o en combinación con otras terapias orales existentes para el tratamiento de la osteoporosis. La liberación pulmonar de la calcitonina y el PTH se vislumbra como una alternativa a las inyecciones. Se han llevado un número reducido de estudios clínicos con calcitonina y PTH inhalable debido a la baja proporción costo/beneficio que a su vez se atribuye a las altas dosis de proteína necesaria para alcanzar niveles terapéuticos apropiados (Depreter et al., 2013).

La hGH (hormona de crecimiento), también conocida como somatotropina, es una hormona peptídica, la cual es generalmente utilizada para promover el crecimiento en niños con enanismo pituitario debido a la deficiencia de hormona de crecimiento. La deficiencia de GH en adultos es también tratada para mejorar anomalías de la restauración del metabolismo energético, masa muscular y fuerza, y función cardiovascular, así como el metabolismo del hueso (Depreter et al., 2013). Para el año 2008 se completó la fase I de estudios clínicos

para el uso de la hGH para la deficiencia del crecimiento mediante la vía inhalable.

LA EPO-fc (eritropoyetina fusionada con Fc) es una hormona glicoproteínica que controla la eritropoyesis, o la producción de células rojas, que tiene fusionada la porción Fc de la inmunoglobulina IgG, esto con la finalidad de mejorar la absorción pulmonar favoreciendo la trancitosis (Bitonti et al., 2004). Este fármaco culminó la primera fase clínica mostrando una dosis-dependencia en relación con la concentración de la proteína de fusión en el suero y el incremento de reticulocitos circulantes (Dumont et al., 2005).

La insulina es un polipéptido con un peso molecular nominal de 6 kDa, ha sido producida tradicionalmente mediante el procesamiento del páncreas porcino y bovino para el asilamiento del producto. Recientemente, la tecnología recombinante ha sido utilizada para la producción de insulina humana *in vitro*. La insulina ha sido una preparación inyectable la cual es su barrera más común para su uso, y como resultado, desde su descubrimiento en 1920, se han investigado nuevas estrategias para su liberación por rutas distintas a la intravenosa y subcutánea.

La primer insulina inhalable para el tratamiento de pacientes con diabetes *mellitus* tipo I y II fue aprobada bajo el nombre de Exubera® en Enero de 2006 (Koussoroplis & Vanbever, 2013). Se trataba de una proteína recombinante elaborada mediante *spray dry*, suplementado con manitol, glicina y citrato de sodio (Siekmeier & Scheuch, 2008), con diámetros de partícula que oscilaban entre 1 – 5 µm (Santos Cavaiola & Edelman, 2014). Este proceso permitía que la biodisponibilidad alcanzara el 60% (Siekmeier & Scheuch, 2008). Sin embargo, menos de dos años después, fue retirada del mercado debido a sus bajas ventas:

se esperaba que fuesen de alrededor de 1 – 4 billones de dólares anuales y en los primeros nueve meses solo se obtuvieron 12 millones (Mack, 2007). Esto provocado principalmente por dos situaciones: el gran tamaño del dispositivo dispensador (Figura 11) y los efectos adversos que la formulación causaban a los pacientes, como tos, disnea, incremento de esputo y epistaxis, además de que estaba contraindicada en pacientes con EPOC y asma (Setter, 2007).



Figura 11. Dispositivo para la administración de Exubera®. Extraído de Mack, 2007

Exubera® no presentaba una eficacia mejorada en comparación con la insulina subcutánea de corta acción (Depreter, 2013), además de que disminuía la habilidad respiratoria de los pacientes.

A partir de la salida del mercado de este producto las diferentes farmacéuticas han estado compitiendo por obtener una insulina inhalable (Tabla 8) pero aboliendo las desventajas que Exubera presentó. Sin embargo, por diversas razones las diferentes

farmacéuticas fueron abandonando los proyectos para la obtención de dicho producto, excepto la corporación MannKind junto con Sanofi Aventis las cuales lograron la aprobación por la FDA en 2014 de su producto: Afrezza®.

Tabla 8. Insulinas inhalables en desarrollo.

Compañía/Socio	Producto (Etapa de Desarrollo)	Formulación
Nektar Therapeutics/Pfizer	Exubera (En el mercado y retirado)	Polvo seco
Aradigm/ Novo Nordisk	AERx iDMS (2008 se cancela)	Gotas líquidas
Alkeres/ Eli Lilly	AIR Insulin (2008 se cancela)	Polvo Seco
MannKind	Technosphere (Aprobado por FDA)	Polvo seco
Generex Biotechnology	Oral-lyn (aprobada en India y Ecuador)	Gotas Líquidas
Kos Pharmaceuticals (parte de Abbott InsukubLabs)	Insulina inhalada	Cristales secos
BioSante Pharmaceuticals	BioAir (preclinical)	Partículas secas recubiertas

Capítulo 4. Afrezza

MannKind Corporation es una compañía biofarmacéutica norteamericana que desarrolló una formulación en polvo de insulina con un alto grado de absorción en los pulmones. Este producto, Afrezza® (Insulina Technosphere), supera algunas de las barreras que contribuyeron al retiro de Exubera y a su aprobación por parte de la FDA.

4.1 Química y su Formulación.

Technosphere es un sistema de liberación de fármacos elaborado de micropartículas de fumaril dicetopiperazina (FDCP), que cuya estructura química es un anillo planar con al menos, seis átomos, que contiene heteroátomos y pares de electrones libres. Estas micropartículas forman microesferas (2-5µm) mediante enlaces de hidrógeno (complejación) en un medio levemente ácido suficiente para la inhalación (Setter, 2007). Durante el proceso de precipitación que es utilizado para la formación de las microesferas en solución, los péptidos y las proteínas son introducidos dentro de la solución, para ser microencapsulados dentro de las microesferas FDCP (Pfutzner, 2005). Posteriormente las partículas esféricas son liofilizadas para formar un polvo adecuado para su inhalación.

Cabe mencionar que cada microesfera contiene únicamente una molécula de insulina (Leone-Bay & Grant, 2006). En la mayoría de las formas farmacéuticas, la insulina regular existe como un hexámero de zinc que debe ser dissociado después de su administración (Brange, 1997), lo cual no permite una rápida absorción, a pesar de que tenga una mayor estabilidad que los monómeros y dímeros. Pero gracias a la formulación de polvo seco Technosphere™ el monómero de insulina es

estabilizado, además de proveer una liberación ventajosa (Leone-Bay & Grant, 2006).

Esta tecnología, además está siendo estudiada para felbamato en ratones y hormona paratiroidea en humanos (Lian et al., 2000; Pfutzner et al. 2003).

4.2 Farmacodinamia

La insulina disminuye los niveles de glucosa mediante la inhibición de la producción de glucosa en el hígado y mediante la estimulación del consumo por músculos esqueléticos y grasa. La insulina también inhibe proteólisis, mejora la síntesis de proteínas e inhibe la lipólisis en adipocitos (Afrezza® (insulin human) inhalation power: US prescribing information, 2015). La insulina de Technosphere está diseñada para liberarse en la parte profunda del pulmón (epitelio respiratorio) donde es absorbida en la circulación sistémica (Steiner et al., 2002; Angelo Angelo at al., 2009), además de que las microesfereas se disuelven al pH del pulmón profundo y la insulina es absorbida en la circulación sistémica. (Afrezza® (insulin human) inhalation power: US prescribing information, 2015; Steiner et al., 2002; Angelo Angelo at al., 2009). Una vez absorbida el mecanismo de acción es comparable al de insulina secretada por el páncreas (Angelo at al., 2009; Neumiller & Campbell, 2010)

4.3 Farmacocinética.

La insulina, como la mayoría de los péptidos y proteínas, presenta cargas que le impiden atravesar membranas biológicas. Se encontró que

cuando la insulina se asocia con el FCDP, el paso de la insulina a través de las membranas y a la sangre, se ve facilitado. Este complejo llega a circulación sistémica rápidamente y alcanza la concentración plasmática máxima (Cmax) en 15 min (tmax), el cual es 2.5 veces más rápido comparado con la insulina administrada por vía subcutánea e inclusive el Cmax es también mayor (Nuffer W et al., 2015) (Figura 12).

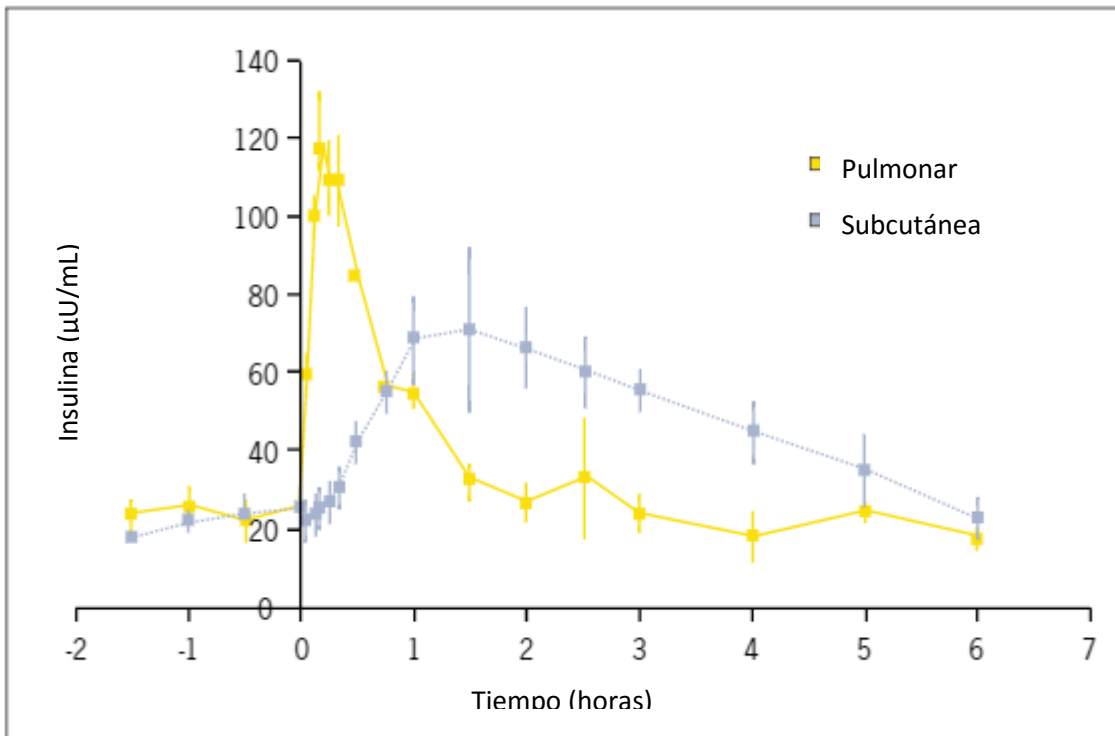


Figura 12. Comparación de perfiles plasmáticos de Afrezza y una insulina administrada por vía transdérmica. (Extraída de Leone-Bay & Grant, 2006)

La insulina Technosphere liberada mediante inhalación tiene una biodisponibilidad relativa de 21-30% comparada con la insulina subcutánea (Potocka, 2011) y también se elimina rápidamente. Esta rápida absorción y eliminación simula la liberación endógena postprandial de la insulina.

4.4 Dosis y Formas Farmacéuticas.

El polvo inhalable de insulina Technosphere está disponible como un cartucho que es insertado dentro de un inhalador e inhalada por la boca un minuto después de la comida (Richardson & Boss, 2007). Los cartuchos están predosificados con 15 unidades o 30 unidades de insulina.

El dispositivo inhalador, nombrado Dreamboat®, el cual utiliza 10 unidades de dosis, es pequeño, compacto, fácil de usar, almacenar y portar, comparado con el de Exubera (Figura 13).

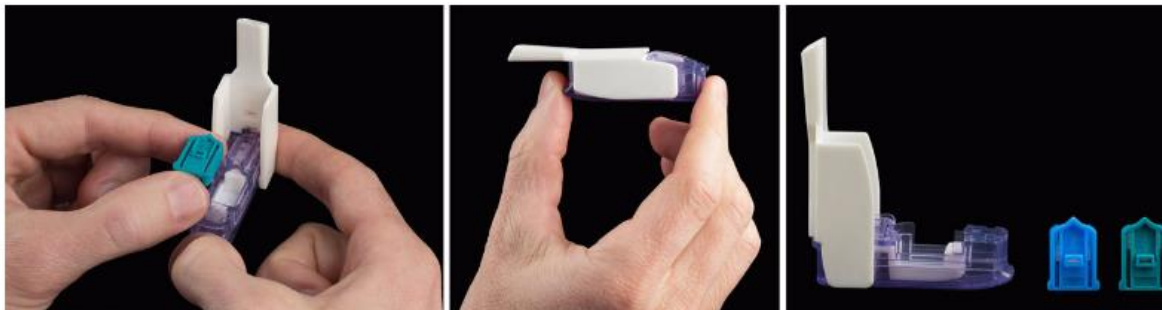


Figura 13. Inhalador Dreamboat utilizado para la administración de Afrezza.

4.5 Ventajas y Limitaciones.

La insulina Technosphere muestra ser la única formulación con un inicio rápido y corto tiempo de duración de la acción, y es igualmente eficaz con una mínima ganancia de peso y ocurrencia menor de eventos hipoglucémicos comparada con insulinas administradas por vía subcutánea (Sarala et al., 2012).

La insulina Technosphere mimetiza de una manera cercana la liberación de la insulina fisiológica y por lo tanto es ideal para el tratamiento con pacientes con diabetes mellitus tipo 2, particularmente en aquellos que no son capaces de iniciar un tratamiento subcutáneo por padecer un fobia a la autoadministración. La absorción de la insulina de esta

formulación no es alterada significativamente en pacientes con EPOC o fumadores, y no tiene un impacto en la función pulmonar en su uso por más de un año (*íbidem*).

4.6 Efectos adversos.

La insulina Technosphere ha sido bien tolerada por voluntarios sanos así como por gente que padece diabetes, Los efectos adversos más comunes son hipoglicemia y tos (*íbidem*).

Conclusión.

Los medicamentos biotecnológicos están ganando terreno en el mercado farmacéutico gracias a las ventajas que presentan frente a las moléculas convencionales: mayor selectividad, así como mayor eficacia, una incidencia de efectos adversos menor y un comportamiento predecible en condiciones *in vivo*. Sin embargo la mayoría de ellos son administrados por vía parenteral que llega a ser dolorosa e incómoda para los pacientes. Con las evidencias anteriormente presentadas como las estrategias para superar la degradación de proteínas en pulmones, los factores que afectan la disponibilidad de péptidos y proteínas, ejemplos de productos que encuentran en el mercado que se administran por vía pulmonar, etc. se aprecia que la factibilidad de generar medicamentos biotecnológicos que sean administrados por una vía distinta a la parenteral, específicamente la pulmonar, es alta, con las ventajas que esta forma de administración conlleva: uso local y sistémico, alta permeabilidad, la gran superficie de absorción de los pulmones (70-140 m² en humanos adultos), baja actividad enzimática y la capacidad de evitar el metabolismo de primer paso. Seguramente en los próximos años el número de productos en el mercado que se administrarán por dicha vía se verá incrementado de manera exponencial.

Bibliografía

1. Abdul-Fattah AM et al. The challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implications. *J. Pharm. Sci* 2007; 96: 1886-1916.
2. Alam Khan, F (2012). *Biotechnology Fundamentals*. CRC Press. Estados Unidos de América. Pp 1 -18; 267 – 312.
3. Ambrosio N, Paggiaro P. The management of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Current Status and Future Perspectives. *Expert Rev. Respir. Med.* 2012; 6(1): 117-127
4. Anderson P. History of Aerosol Therapy: Liquid Nebulization to MDIs to DPIs. *Respiratory Care* 2005; 50 (9): 1139-1150
5. Angelo R et al. Technosphere insulin: Defining the role of Technosphere particles at the cellular level. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2009; 3(3), 545-554.
6. Ashish, K et al. Pulmonary Drug Delivery System. *International Journal of PharmTech Research*. 2012; 4(1): 293-305.
7. Bansil R, Turner B. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2006; 11 (2-3); 164-170.
8. Bhatnagar BS et al. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm. Dev. Technol.* 2007; 12: 505-523.
9. Bhorade A, Stern E. Immunosuppression for Lung Transplantation. *Proceeding of the American Thoracic Society* 2009; 6: 47-53
10. Bice J et al. Biologic Targeted Therapy in Allergic Asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014; 112: 108-115.
11. Bitonti et al. Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non human primates through an immunoglobulin transport pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101: 9763-9768.

12. Britannica Educational Publishing (2011). The respiratory system. Encyclopaedia Britannica Inc. Estados Unidos de América. Pp. 19-36
13. British Guideline on the Management os Asthma (2014).
14. Brange J et al. Insulin structure and diabetes treatment. *Curr Sci*, 1997; 72: 470-476.
15. Bur M et al. Assessment of transport rates of proteins and peptides across primary human alveolar epithelial cell monolayers. *Eur J Pharm Sci* 2006; 28: 196–203
16. Cal K, Sollohub K. Spray drying technique 1: Hardware and process parameters. 2010; 99: 575-586.
17. Calvete J et al. Aerosol de alfa-1-antitripsina en el Tratamiento de la Fibrosis Quística. *Anales Españoles de Pediatría* 1996; 44: 109-111
18. Chang L, Pikal MJ, Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *J. Pharm. Sci.* 2009; 98: 1325-1330.
19. Chaturvedi N et al. Pulmonary Drug Delivery System: Review. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2013; 5(3): 7-10.
20. Chumsae C et al. Comparision of methionina oxidation in termal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody. *J Chromatogr.* 2007; B850: 285-294.
21. Condos R et al. Regional deposition of aerolized interferon- γ in pulmonary tuberculosis. 2004; 125: 2146-2155.
22. Cox et al. VIP elevates platelet cyclic AMP (cAMP) levels and inhibits in vitro platelet activación induced by platelet-activating factor (PAF). *Peptides*. 1984; 5: 325-328.
23. Depreter F et al. Inhaled proteins: Challenges and Perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013 Disponible en línea.
24. Ducreux J, Vanbever R. Crucial biopharmaceutical issues facing macromolecular candidates for inhalation: the role of macrophages

- in pulmonary protein clearance. *Respir Drug Deliv Eur* 2007; 2007: 31-41.
25. Dumont J et al. Delivery of an erythropoietin-Fc fusion protein by inhalation in humans through an immunoglobulin transport pathway. *J. Aerosol Med.* 2005; 18: 294-303.
 26. Ezan E. Pharmacokinetic studies of protein drugs: past, present and future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013; 65(8): 1065-1073.
 27. Fahy JV et al. Effect of aerosolized anti-IgE (E25) on airway responses to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160: 1023-1027.
 28. Franco M, Savio E. Medicamentos Biotecnológicos. Conceptos Básicos y Relevancia en el Contexto Clínico. *Tendencia en Medicina* 2008: 5-12
 29. Gelber C, Hassager A. Methods and Compositions for Minimizing Accrual of Inhalable Insulin in the Lungs. US 2006/0153778 A1 CI. 424/46; 541/3; 514/225.02
 30. Geller D. Comparing Clinical Features of the Nebulizer, Metered-Dose Inhaler, and Dry Powder Inhaler. *Respiratory Care.* 2005; 50 (10): 1313-1322
 31. Guía clínica
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/433-11_Hipertensixn_arterial_pulmonar/GER_Hipertensixn_Arterial_Pulmonar.pdf
 32. Hertel S (2014). Pulmonary Delivery of Pharmaceutical Proteins by Means of Vibrating Mesh Nebulization. (Tesis de Doctorado). Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Munich. Alemania
 33. Ho R, Gibaldi M (2013) *Biotechnology and biopharmaceuticals: transforming proteins and genes into drugs* (2nd Edition). Wiley Blackwell. Estados Unidos Pp. 3-10

34. Hoiby, N. Recent Advances in the Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections in Cystic Fibrosis. 2011; 9:32: 1-7
35. Hsu et al. Determining the optimum residual moisture in lyophilized protein pharmaceuticals: Dev. Biol. Stand. 1991; 74: 255-271.
36. Ichiki Y et al. Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. FEBS Lett. 1994; 338: 6-10.
37. Kakishita M et al. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. Clin Sci (Lond). 1999; 96: 33-39.
38. Kim KJ, Malik AB. Protein transport across the lung epithelial barrier. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003; 284: L247-59.
39. Koussoroplis, S & Vanbever, R (2013). Peptides and Proteins: Pulmonary Absorption. Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology (4^a Edición). Taylor and Francis. New York, EUA
40. Kowk, P; Chan H. Pulmonary Drug Delivery. Ther. Del. 2013; 4(8): 877-878.
41. Lee E et al., The bioavailability of intranasal salmon calcitonin in healthy volunteers with and without a permeation enhancer. Pharm Res. 1994; 11(5): 747-50.
42. Leone-Bay A, Grant M. Technosphere[®] technology: a platform for inhaled protein therapeutics. ONdrugDelivery Ltd. Pulmonary Delivery Innovative Technologies Breathing New Life into Inhalable Therapeutics. 2006: 8-11.
43. Leuchte et al. Inhalation of vasoactive intestinal peptide in pulmonary hypertension. Eur Resp J. 2008; 32: 1289-1294.
44. Ley General de Salud Estados Unidos Mexicanos
45. Lian H et al. A self-complementary, self-assembling microsphere system: application for intravenous delivery of the antiepileptic and

- neuroprotectant compound felbamate. *J. Pharm. Sci.* 2000; 89: 867-75.
46. Li Y, Mitra AK. Effect of phospholipidos chain lenght, concentration, charge, and vesicle size on pulmonary insuline absorption. *Pharm. Res* 1996; 13: 76-79.
 47. Liu et al. Moisture induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state. *Biotechnol. Bioeng.* 1991; 37: 177-184.
 48. Lombry C at al. Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L1002-8.
 49. López de Heredia J, Valls A (2008) Síndrome de Dificultad Respiratoria. *Asociación Española de Pediatría. España* Pp 305-310
 50. Ma X et al. Characterization monoclonal antibody to tumor necrosis factor (TNF-MAb) formation for freeze-drying cyrcle development. 2001; 18: 196-202.
 51. Mack G. Pfizer Dumps Exubera. *Nature Biotechnology* 2007; 25 (12): 1131-1132
 52. Marino M et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled GLP-1 (MKC253): proof-of-concept studies in healthy normal volunteers and in patients with type 2 diabetes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2010; 88: 243-250.
 53. Maltesen M, van de Weert M. Drying methods for protein pharmaceuticals . *Drug Discov. Today Technol.* 2008; 5: e81-e88-
 54. Martin-Moe S, Lim FJ, Wong RL, Sreedhara A, Sundaram J, Sane SU. A new roadmap for biopharmaceutical drug product development: integrating development, validation and quality by design. *J Pharm Sci.* 2011; 100(8): 3031-3043.
 55. Maruno K, et al. VIP inhibits basal and histamine-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells, *Am J Physiol* 1995; 268: L1047-L1051.

56. Morjaria J et al. Biologic and Pharmacologic Therapies in Clinical Development for the Inflammation Response in COPD. 2010; 15: 396-405.
57. Moss B et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of aerosolized interferon gamma-1b in patients with mild to moderate cystic fibrosis lung disease. *Pediatr. Pulmonol.* 2003; 39: 209-218.
58. Nagaya et al. Hemodynamic, renal and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 2000; 101: 498-503
59. Neumiller J, Campbell R. Technosphere insulin: An inhaled prandial insulin product. *BioDrugs.* 2010; 24(3): 165-172.
60. Newman S. Principles of Metered-Dose Inhaler Design. *Respiratory Care* 2005; 50(9): 1117-1190
61. Nokhodchi A and Martin G (2015). *Pulmonary Drug Delivery. Advances and Challenges.* Wiley. Reino Unido. Pp 2-11, 35-53.
62. Nossaman et al. Comparative effects of adrenomedullin, an adrenomedullin analog, and CGRP in the pulmonary vascular bed of the cat and rat. *Life Sci.* 1995; 56: PL63-PL66.
63. Nossaman et al. Pulmonary vasodilator responses to adrenomedullin are reduced by NOS inhibitors in rats but not in cats. *Am J Physiol.* 1996; 270: L782-L789.
64. Nuffer W et al. Technosphere Insulin (Afrezza): a new, inhaled prandial insulin. *Annals of Pharmacotherapy.* 2015; 49(1): 99-106.
65. Olmsted SS et al. Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus. *Biophys J* 2001; 81: 1930-7
66. Ohtake S, Kita Y, Arakawa T, 2011. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 1053-1073.

67. Osterberg et al. Pharmacokinetics of desmopressin administered as an oral lyophilisate dosage form in children with primary nocturnal enuresis and healthy adults. *J Clin Pharmacol.* 2006; 46(10):1204-1211
68. Owji A. An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. *Endocrinology.* 1995; 145: 152-153.
69. Pasqualli I et al. Solid-state chemistry and particle engineering with supercritical fluids in pharmaceuticals. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006; 27: 299-310.
70. Patil, J; Sarasija, S. Pulmonary Drug Delivery Strategies: A concise, systematic Review. *Lung India* 2012; 29(1): 44-49.
71. Patton JS et al. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 338-44
72. Pelaia G et al. The potential of Biologics for the Treatment of Asthma. *Nature Reviews Drug Discovery* 2012; 11(12): 958-972
73. Perez-Gil J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *BBA.* 2008; 1778 (7-8): 1676-1695.
74. Perkov V et al. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of pulmonary hypertension. *J Clin Invest.* 2003; 111: 1339-1346.
75. Pfutzner A, Forst T. Pulmonary insulin delivery by means of the Technosphere™ drug carrier mechanism. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; 2: 1097-106
76. Pfutzner A et al. Pilot study with technosphere/PTH (1-34): a new approach for effective pulmonary delivery of parathyroid hormone (1-34). *Horm Metab Res* 2003; 35: 319-23
77. Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2010; 392: 1-19.

78. Potocka E et al. Population pharmacokinetic model of human insulin following different routes of administration. *J. Clin Pharmacol.* 2011; 51: 1015-1024.
79. Purewal D, Grantt D (1997). *Metered Dose Inhaler Technology.* Taulor & Franics Group. Estados Unidos. P. 11
80. Quan C et al. A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior. *Anal. Biochem.* 2008; 373: 179-191.
81. Raff, H & Levitzky, M (2011). *Medical Physiology: A Systems Approach.* Mc Graw Hill Education. Estados Unidos de América. Pp 305-385.
82. Raja S, Raja S. Treating Pulmonary Arterial Hypertension: Current Treatments and Future Prospects. *The Adv. Chronic Dis.* 2011; 2(6): 359-370
83. Richardson PC, Boss AH. Technosphere insulin technology. *Diabetes Technol Ther.* 2007; 9(Suppl 1): S65-72.
84. Rodney J et al (2013). *Biotechnology and Biopharmaceuticals. Transforming Proteins Into Drugs (2ª Edición).* Wiley-Blackwell. Estados Unidos. Pp 430-436.
85. Santos Cavaiola T, Edelman S. Inhaled insulin: a breath of fresh air? A review of inhaled insulin. *Clin Ther* 2014; 36: 1275-89
86. Sara N et al. Techosphere insulin: a new inhaled insulin. *Practical Diabetes.* 2012; 29(1): 23-24.
87. Sattarahmady N et al. Formation of the molten globule like state during prolonged glycation of human serum albumin. *Biochim. Biophys, Acta* 2007; 1770: 933-942.
88. Schachner H. The Science Behind Exubera. *Drug Development Research* 2008; 69: 130-137

89. Sczlachcic A et al. Longer Action Means Better Drug: Tuning Up Protein Therapeutics. *Biotechnology Advances*. 2011; 29: 436-441.
90. Setter S et al. Inhaled dry powder insulin for the treatment of diabetes mellitus. *Clin Ther* 2007; 29: 795-813
91. Shaikh, S et al. Recent Advances in Pulmonary Drug Delivery System: A review. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 2010; 2(4): 27.31
92. Shire, S (2015). *Monoclonal Antibodies. Meeting the Challenges in Manufacturing, Formulation, Delivery and Stability of Final Drug Product*. Elsevier. Reino Unido.
93. Shoyele SA, Cawthorne S. Particle engineering techniques for inhaled biopharmaceuticals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006; 58: 1009-1029.
94. Siekmeier R, Scheuch G. Inhaled insulin- does it become reality? *J Physiol Pharmacol*. 2005; 59: 81-113.
95. Škalko-Basnet, Nataša. Biologics: The role of delivery systems in improved therapy. *Biologics: Targets and Therapy* 2014;8 107-114
96. Soetaert, W & Vandamme, E (2010). *Industrial Biotechnology. Sustainable Growth and Economic Success*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Alemania. Pp. 17-77.
97. Sou T et al. New Developments in Dry Powder Pulmonary Vaccine Delivery. *Trends in Biotechnology* 2011; 29 (4): 191-198
98. Steiner S et al. Technosphere/insulin proof of concept study with a new insulin formulation for pulmonary delivery. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002; 10(1): 17-21.
99. Thieman, W & Palladino M (2010). *Introducción a la Biotecnología (2ª Edición)*. Pearson Educación. Pp 1-25; 260 - 303.
100. Thorens B et al. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and

- exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes*. 1993; 42: 1678-1682.
101. US FDA. Afrezza® (insulin human) inhalation powder: US prescribing information. 2015, <http://www.fda.gov>, Accessed 18 Jun 2016.
102. Vlasak J et al. Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody. *Anal. Biochem* 2009; 392: 145-154.
103. Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm* 1999; 185: 129-188.
104. Wang W et al. Protein aggregation-pathways and influencing factors. *Int. J. Pharm.* 2010; 390: 89-99.
105. Xu X, Vugmeyster Y. Challenges and opportunities in absorption, distribution, metabolism and excretion studies of therapeutic biologicals. *AAPS J.* 2012; 14(4): 781-791.
106. Yadav N, Lohani A. Dry Powder Inhalers: A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Science* 2013; 3(2): 142-155
107. Zang L et al. Residual Metals Cause Variability in Methionine Oxidation Measurements in Protein Pharmaceuticals Using LC-UV/MS Peptide Mapping. *Journal of Chromatography B.* 2012; 895-896: 71-76.