

LAS DROGAS LIPOSOMALES

por

Eduardo A. Castro*

Resumen

Castro, E.: Las drogas liposomales: Rev. Acad. Colomb. Cienc. 23(89): 625-634, 1999. ISSN 0370-3908.

En este artículo de actualización y divulgación científica se brinda un panorama de los últimos desarrollos en la investigación y las aplicaciones de las drogas liposomales. Esta clase de complejos permite que la descarga de las sustancias activas se efectúe en forma direccionalizada sobre el sitio deseado, minimizando así los efectos laterales nocivos que muchas veces no permiten el uso y/o la concentración necesaria de las drogas.

Finalmente se analizan algunas posibilidades de interés en el terreno de la terapia genética.

Palabras clave: Drogas liposomales.

Abstract

Liposomal drugs permit the release of active substances that act in directed form on a desired site, minimizing side effects.

Key words: Liposomal drugs.

Introducción

En 1997 la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica brindó la aprobación comercial para que las drogas anticancerígenas encapsuladas en liposomas y una forma liposomal de una potente droga antihongos para uso en seres humanos pudieran expenderse en el circuito co-

mercial normal. Estas acciones marcan la emergencia de los liposomas como una aproximación práctica a la liberación farmacéutica dirigida. Los sistemas de liberación liposomáticos también han sido aprobados en varios países europeos. Estos resultados exitosos acaecen luego de 30 años de alternancias entre la euforia y la desesperación, entre los conceptos excitantes y los retrocesos experimentales.

De hecho, los liposomas han estado comercialmente disponibles como sistemas de liberación de drogas desde 1990. La primera licencia para un producto se aceptó en Irlanda para la formulación liposomal del agente

* CEQUINOR y Laboratorio LADECOR, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, C.C. 962, 1900 La Plata, Argentina. E-mail: castro@nahuel.biol.unlp.edu.ar.

antifúngica *amphotericin B*. Este producto ahora está aprobado en 29 países para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas de carácter severo. Los efectos laterales tóxicos del tratamiento convencional en la *amphotericin B*, que incluyen fiebre, náusea, escalofrío y daño al hígado con peligro de vida, se han atenuado marcadamente en la formulación liposomal de la misma dosis. Otros productos con base lipídica de la *amphotericin B* no-liposomal también han obtenido la aprobación comercial tan europea como de parte de la FDA.

Estructura del liposoma

Los liposomas son estructuras sintéticas de tipo celular formadas por fosfolípidos, que son los bloques de construcción molecular básica de las membranas celulares¹⁻². Los fosfolípidos consisten de un esqueleto con tres átomos de carbono con un grupo polar hidrofílico, tal como la *fosfocolina*, típicamente unido a un carbono terminal. Un par de ácidos grasos que constituyen las cadenas laterales, se encuentran ligados a los otros dos átomos de carbono (Figura 1). Estas cadenas laterales de ácidos grasos pueden tener distinta extensión y pueden contener enlaces dobles y átomos diferentes al carbono. Varias estructuras de este tipo se encuentran en la naturaleza.

Cuando las moléculas anfífilas, tales como los fosfolípidos, se mezclan con agua, espontáneamente se reorganizan en estructuras bien definidas. En uno de los reagrupamientos usuales, los grupos extremos polares interaccionan con el agua y las cadenas laterales (ácidos grasos) lo hacen con sus homólogas de otras moléculas fosfolípídicas para formar bicapas de tipo membranar. Estas bicapas forman barreras permeables a las moléculas polares en tanto que las moléculas dentro de la bicapa mantienen una considerable flexibilidad y movilidad lateral. Algunas proteínas, glicoproteínas, glicolípidos y otras moléculas anfífilas se pueden incorporar a estas estructuras bicápicas, asemejándose a la extensa complejidad encontrada en las membranas celulares.

En el año 1965 se describieron una variedad de morfologías de capas fosfolípídicas, incluyendo estructuras cerradas que se formaron por la simple vía de mezclar fosfolípidos y agua³. La más común de estas estructuras contenían muchas capas bimoleculares concéntricas y cerradas de fosfolípidos, cada una de ellas separadas por un compartimento acuoso. Estas estructuras cerradas recibieron la denominación de "*liposomas*"⁴. Los fosfolípidos hidratados con agua en exceso y luego sometidos a un esfuerzo intenso por medio de una sonda ultrasónica o a una homogenización, pueden formar vesículas esféricas, cerradas y del tipo morfológico de concha que contiene un

volumen acuoso encapsulado y protegido de la bicapa fosfolípídica exterior. Estos liposomas son pequeños, típicamente de unos 100 nm de diámetro y de aproximadamente 1/10 de extensión de la mayor parte de las células⁵.

Como los liposomas están constituidos por las mismas moléculas que las membranas celulares vivientes, ellas son vehículos potencialmente ideales para la liberación dirigida de drogas. Es probable que ellas desencadenen fuertes reacciones inmunes, y cuando se degraden, sus componentes sean indistinguibles de los lípidos normalmente hallados en el cuerpo viviente. Como los liposomas son más pequeños que las células rojas de la sangre circulante, ellas se pueden inyectar fácilmente, aunque son lo suficientemente extensas como para encapsular una gran variedad de moléculas, ya sea en su centro acuoso o en la membrana lipídica. Además, las vesículas multilaminares proveen de otro vehículo para

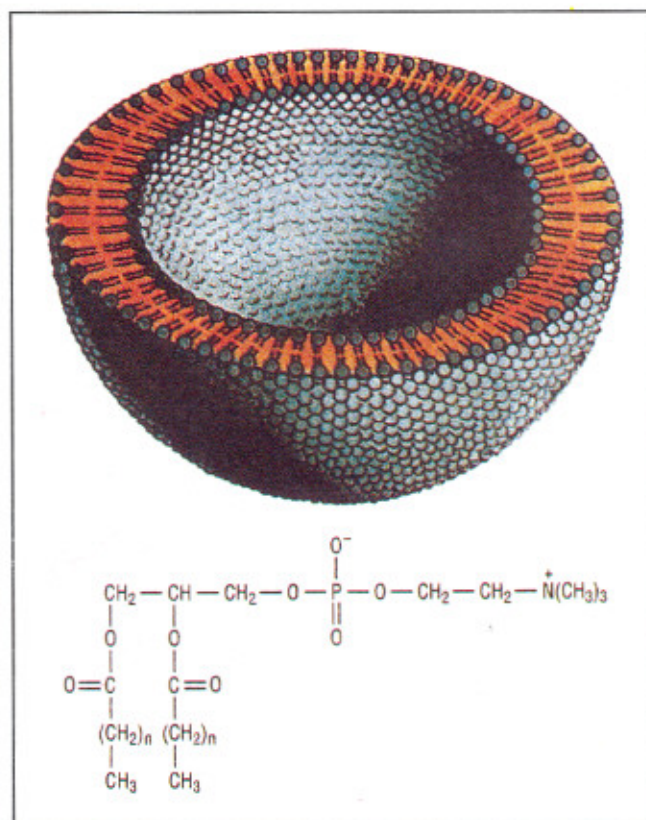


Figura 1. Las moléculas de los fosfolípidos son los constituyentes primarios de los liposomas. Los mismos consisten de un fosfato hidrofílico, conteniendo un grupo cabezal (mostrado en azul), unido a través de un esqueleto de glicerol y uniones ésteres a dos cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas (indicadas en color rojo). También se muestra la estructura de un fosfolípido ampliamente empleado en los liposomas (dipalmitoilfosfatidilcolina, n=14).

una descarga sostenida de las drogas. Las moléculas de drogas encapsuladas en los espacios acuosos entre cada una de las bicapas se liberan lentamente, a medida que la estructura de multicapas se degrada.

Los descubrimientos originales sobre las estructuras liposomales fueron transformados rápidamente en realidades comerciales. Así, en el año 1972 se publicó un trabajo sobre el desarrollo del concepto de emplear liposomas conteniendo enzimas para tratar enfermedades de reservas resultantes de desórdenes metabólicos congénitos ⁶. Con base en los resultados encontrados se infirió que los liposomas podían llegar a constituir un vehículo promisorio para administrar las enzimas a los pacientes. Más tarde se investigó el destino de los liposomas que contenían suero de albúmina humana radiomarcada en tres pacientes de cáncer ⁷. Se constató que en la mayoría de los órganos, la radiactividad parecía ser absorbida preferencialmente por los tejidos malignos. Estos hallazgos ofrecieron un fuerte apoyo al uso de los liposomas como transportadores de drogas en la quimioterapia de cáncer.

Otros trabajos se concentraron en la biodistribución de los liposomas y la forma de interactuar con las células, incluyendo ejemplos de toxicidad selectiva. Así, por ejemplo, se demostró que cuando los anticuerpos producidos por conejos en respuesta a la inmunización contra las células de glóbulos rojos estaban enlazados en forma covalente a la superficie de los liposomas, la unión de aquellos liposomas a los glóbulos rojos humanos *in vitro* aumentaba por un factor 200 respecto de los liposomas sin modificación ⁸. También se siguió el destino intracelular de varias sondas fluorescentes y oro coloidal atrapado en liposomas *in vitro* cargadas negativamente ⁹. Los liposomas cargados fueron tragados por las células y la rotura de los liposomas en el entorno ácido y rico en enzimas de la vesícula endocítica (antes que la fusión del liposoma) permitió que las moléculas atrapadas en el liposoma pudieran escapar hacia el citoplasma.

Suministrando estabilidad

Los investigadores involucrados en las primeras etapas de la investigación sobre este tema prontamente se dieron cuenta que los liposomas no eran simples curiosidades de laboratorio o útiles modelos de estructuras membranales y que podían servir de base para una poderosa tecnología de suministro de drogas. Sin embargo, primero se debían vencer tres serias dificultades antes que se llegara a concretar todo el potencial de los liposomas como vehículos transportadores de drogas. En

primer lugar, tenían que ser formulados los liposomas que debían mantener su integridad física en la corriente sanguínea y retener sus contenidos. En segundo término, como cuerpos extraños en el sistema circulatorio, es esperable que los liposomas puedan ser expulsados eficientemente por las células fagocíticas localizadas en el hígado, el bazo y otros órganos. Si los liposomas habrán de ser útiles como vehículos liberadores de drogas, deberían alcanzar los sitios destinados a tales efectos en el cuerpo antes que los fagocitos las eliminen. Finalmente, se necesitan métodos eficientes para encapsular a las drogas en los liposomas.

Hacia fines de la década del 70 se usó una técnica denominada “**espectroscopía de correlación angular perturbada de rayos gama**” (g-PAC) ¹⁰⁻¹¹ para determinar la integridad de los liposomas en vivo en ratones. En un experimento de g-PAC, un radioisótopo tal como el ¹¹¹In³⁺ decae con la emisión en cascada de dos rayos gama ¹². La gráfica del número de eventos coincidentes versus el ángulo entre los detectores de la emisión de los dos rayos gama se llama la “**correlación angular**”. Esta correlación puede ser perturbada si el núcleo radiactivo está unido a una molécula que puede modificar su orientación en solución.

Cuando el ¹¹¹In³⁺ se encapsula en el interior de un liposoma y luego se inyecta en un ratón, el ¹¹¹In³⁺ puede voltearse libremente en el espacio interior acuoso del liposoma en tanto que la estructura liposomal permanece intacta. Sin embargo, cuando el liposoma se degrada y el ¹¹¹In³⁺ se libera, el isótopo se puede unir a proteínas de alto peso molecular en el torrente sanguíneo, causando un cambio en el tiempo de volteado rotacional del isótopo, lo cual es detectado directamente por la g-PAC ^{10,11}. Con el uso del marcador radiactivo es posible determinar no sólo hacia donde se dirige el liposoma sino también su integridad en la sangre o en cualquier otro tejido del animal. El empleo de esta técnica permitió demostrar que los liposomas formulados con técnicas que eran usuales en los 70 se desintegran rápidamente en la presencia de suero o *in vivo* ¹⁰⁻¹¹.

El método g-PAC permitió determinar en forma rápida el destino de varias formulaciones liposomales en animales experimentales. Así, por ejemplo, los liposomas compuestos por dos componentes comunes de las membranas celulares —el disteroifosfatidil colina (DsPC; un fosfolípido con cadenas laterales de un ácido graso saturado que contiene 18 átomos de carbono) y el colesterol— mostraron una buena estabilidad *in vivo* y largos tiempos de circulación ¹⁰⁻¹¹. En cambio, los liposomas compues-

tos por el dipalmitoilfosfatidil colina (DPPC, un fosfolípido con cadenas laterales de un ácido graso saturado con 16 átomos de carbono) y el colesterol, eran eliminados mucha más rápidamente en la solución. Estas observaciones se explicaron mostrando que las interacciones de las membranas liposomales con las proteínas plasmáticas podrían aumentar la captura de los liposomas por los fagocitos¹³. Los experimentos de g-PAC mostraron que este proceso, denominado "*opsonización*" se puede minimizar formulando a los liposomas a partir de fosfolípidos bien caracterizados con un contenido de cadenas laterales extensas de ácidos grasos saturados.

Otra forma de reducir la eliminación de los liposomas por los fagocitos se descubrió en el año 1987¹⁴. Se constató que adhiriendo a la superficie del liposoma sustancias hidrofílicas tales como los gangliósidos se reduce la velocidad de degradación de los liposomas por las células fagocíticas en el hígado y el bazo. Posteriormente, otros grupos demostraron que el polietilenglicol (PEG) suministra una barrera al proceso de opsonización que puede aumentar significativamente el tiempo de vida de circulación de un liposoma¹⁵. Los liposomas sintetizados con fosfolípidos tales como el DSPC y el colesterol circulan por períodos extensos sin el PEG ya que la bicapa fuertemente empaquetada que se forma con estos materiales resiste substancialmente la opsonización.

Captación rígida

Los investigadores comenzaron a considerar tempranamente la posibilidad de modificar la superficie liposomal para mejorar la captura por tumores y otros blancos de interés médico, aún antes de que se demostrara que los liposomas que mostraban reproducibilidad *in vivo* se podían preparar.

Las membranas celulares tienen muchas moléculas funcionalmente activas sobre sus superficies, incluyendo proteínas, glicoproteínas y glicolípidos. Las secuencias detalladas de los carbohidratos y las proteínas componentes de estas moléculas juegan un papel central en la actividad biológica de la célula. Adosando en forma covalente estas moléculas a la superficie liposomal se puede esperar que la actividad y la distribución biológica se afecte significativamente *in vivo*. Esta aproximación se estudió¹⁶ uniendo anticuerpos monoclonales a los liposomas para acrecentar la captura en células que expresan antígenos específicos. El uso de anticuerpos sigue constituyendo una opción de focalización atractiva.

También se ha explorado la modificación de la superficie liposomal con oligosacáridos¹⁷⁻¹⁸. Se usó un eslabón químico consistente en una secuencia de átomos de carbono para unir uno o varios azúcares al colesterol. Se situó a un átomo de azufre entre el eslabón y los azúcares para neutralizar a las enzimas que podían cortar la unión de los azúcares al eslabón. La porción de colesterol se incorpora fácilmente en la parte hidrofóbica de la bicapa liposómica, dejando a la secuencia de azúcares expuesta sobre la superficie del liposoma. De tal forma, los liposomas fueron atrapados por las células tumorales en los cultivos.

Sin embargo, cuando estos liposomas fueron inyectados por vía intravenosa en ratones con tumores, las modificaciones químicas generaron un aumento manifiesto en la velocidad de remoción de la circulación de los liposomas modificados, o sea el efecto inverso al buscado. En estudios realizados a principios de la década del 80 se encontró que, contrariando expectativas previas, los liposomas sin modificación superficial alguna eran los más eficientes para el tratamiento tumoral *in vivo*. Investigaciones cuidadosas acerca de la distribución de liposomas marcados con ¹¹¹In³⁺ mostraron que la relación de captura de los liposomas en los tumores comparadas con otros sitios, tal como el hígado, era muy sensible a las dimensiones liposomales. Los liposomas pequeños de medidas uniformes mostraban mayor posibilidad de acumularse en los tumores.

Varios caminos posibles compiten para la captura y degradación de los liposomas. Pueden ser capturados por las *células de Kupffer*, que son células fagocíticas halladas en los principales vasos sanguíneos y en las sinusoides del hígado. La velocidad de ingestión aumenta marcadamente cuando crecen las dimensiones de la partícula. Si los liposomas son suficientemente pequeños, entonces pueden pasar a través de los poros de filtración (llamados "*fenestraciones*") en las células endoteliales que constituyen las paredes de los vasos sanguíneos del hígado. Luego son capturadas por los hepatocitos, las principales células del hígado. Entonces, la minimización de la captación por el hígado requiere partículas lo suficientemente pequeñas como para poder escapar a las células de Kupffer, pero bastante grandes a fin de pasar a través de las fenestraciones. Un interesante estudio de micrografía electrónica sobre las fenestraciones en las sinusoides del hígado suministró la información necesaria para balancear estos dos requerimientos¹⁹. Así, se encontró que la máxima dimensión era ~ 100 nm. En la práctica, los liposomas del orden de los 40-80 nm mues-

tran la mínima velocidad de remoción desde el torrente sanguíneo.

Normalmente, los capilares sanguíneos son permeables solamente a pequeñas moléculas tales como el agua o la glucosa. Sin embargo, un tumor en rápido crecimiento descarga factores angiogénicos que inducen a su vez el crecimiento veloz de los capilares dentro del tumor, trayendo oxígeno y nutrientes. Cuanto más rápidamente se construyen estos capilares, menos perfecta resulta su arquitectura y así se generan espacios entre las células endoteliales que son lo suficientemente grandes como para que aún los liposomas de 40 a 80 nm puedan pasar a través. La optimización de las medidas del liposoma y su generación con suficiente robustez y estabilidad estructural, hace posible dirigir su biodistribución de manera significativa a favor de los tumores. Estos estudios significaron un descubrimiento valioso acerca de la estructura vascular de los tumores²⁰⁻²¹. Además, ellos suministraron un mecanismo general que explica la localización de los liposomas en los tumores en rápido crecimiento.

El cargado de los liposomas con las drogas

La eficiente encapsulación dentro de los liposomas es muy importante para muchas drogas tanto por razones económicas como por motivos de seguridad. La encapsulación adecuada demanda métodos prácticos para aumentar la concentración de la droga dentro de los liposomas. Los métodos de cargado activo conducen a las moléculas a través de la bicapa a fin de aumentar la concentración interna. En el año 1976 se demostró que las aminas liofílicas, tal como la *morepinefrina* se puede cargar en los liposomas apelando a un simple gradiente de pH²².

En el año 1979 se constató que la velocidad de transporte de iones específicos a través de las bicapas liposómicas se puede aumentar incorporando ionóforos en la bicapa²³. Estas moléculas aceleran el transporte de iones a través de las membranas por formación de canales a través de éstas o formando complejos que pueden lanzar a los iones a través de las membranas. Se encontró que los liposomas pueden cargar cuantitativamente al ión ¹¹¹In³⁺ encapsulando primero un agente quelante dentro del corazón del liposoma e incorporando luego un ionóforo en la bicapa liposomal. Cuando estos liposomas son suspendidos en presencia de ¹¹¹In³⁺, los iones se transportan rápidamente al otro lado de la membrana, impulsados por el gradiente de concentración.

Una vez que están alojados en el interior, se complejan con el agente quelante de modo tal que ya no pueden

abandonarlo. Este procedimiento permite que los reactivos de diagnóstico basados en los liposomas sean preparados como "cajas frías" de liposomas modificados con un agente quelante y un ionóforo. Cuando se agrega la sal de un radioisótopo apropiado (típicamente uno con una vida media corta) a la preparación justo antes de su empleo, el radioisótopo se carga rápida y cuantitativamente dentro del centro del liposoma. Más tarde se usaron gradientes iónicos para promover una adición eficiente del anestésico *cloropromacina* y la droga anticancerígena *vinblastina* dentro de grandes liposomas unilaminares²⁴.

Debido a la alta eficiencia del cargado vía el gradiente iónico (o activo), este método se usa en muchos laboratorios para encapsular drogas en los liposomas. Por ejemplo, tres productos de antraciclina liposomal en pruebas clínicas emplean variaciones de cargado iónico para entrar a los compuestos liofílicos amínicos doxorubicina y daunorrubicina. Las drogas se agregan a las soluciones de liposomas preformados en los cuales ya hay un gradiente entre el interior y el exterior o en uno donde se lo crea. El gradiente químico se descarga cuando la droga pasa a través de la bicapa y un alto porcentaje de la droga se aloja dentro del liposoma.

El tratamiento de infecciones por hongos

Las infecciones por hongos constituyen una seria amenaza a los receptores de trasplantes de médula ósea, pacientes cancerosos sujetos a tratamientos quimioterapéuticos y otros con los sistemas inmunológicos debilitados. Las infecciones más serias usualmente se tratan con anfotericina B, un agente antifúngico con un amplio espectro poliélico. Desafortunadamente, la anfotericina B produce una toxicidad al riñón con riesgo de vida para muchos pacientes cuando se usan dosis cercanas al nivel terapéutico. Entonces, esta droga constituye una candidata ideal para someterla al encapsulamiento liposomal.

A principios de la década del 80 se encapsuló anfotericina B en liposomas multilaminares y se verificó en pruebas clínicas que tal procedimiento reducía significativamente la toxicidad de la droga²⁵. Los liposomas con anfotericina B fueron probados inicialmente en 18 pacientes en quienes la droga libre no había detenido el desarrollo de la infección por hongos del tipo "*Aspergillus*" o "*Candida*". La mayor parte de los pacientes respondió a la droga liposomal, la cual se pudo administrar en mayor dosis debido a que era menos tóxica para los riñones.

En el año 1983 se reconoció el potencial de los liposomas para aumentar el índice terapéutico de la anfotericina B. Se trabajó sobre vesículas laminales pequeñas en las cuales la droga se incorporó dentro de la bicapa liposomática²⁶. Este método también redujo marcadamente la toxicidad de la anfotericina B. Por ejemplo, una simple inyección intravenosa de la anfotericina B es letal para el 50% de los ratones en una dosis (LD₅₀) de 2.3 mg/kg de peso del cuerpo en la misma variedad de la especie. La preparación del liposoma tenía un LD₅₀ > 160 mg/kg de peso del cuerpo en la misma variedad de ratones. La toxicidad se reduce sin pérdida alguna de eficacia. Como la incorporación de una droga dentro del liposoma disminuye significativamente la incidencia de efectos laterales, se pueden incrementar las dosis a los pacientes humanos hasta un 3-5 mg/kg del peso del cuerpo y por día (si es necesario) sin que haya toxicidad del riñón con riesgo de sobrevida²⁷. La dosis máxima de droga libre que puede suministrarse es 1 mg/kg de peso del cuerpo y por día, y la mayor parte de los pacientes no pueden recibir este alto dosaje por más de unos pocos días.

El análisis del producto comercial denominado *AmBisome* por medio de la espectroscopía de dicroísmo circular indica que la anfotericina B forma racimos en la bicapa liposomática²⁸. La estructura más estable se supone que es un canal formado por dos barriles unidos extremo a extremo, cada uno de los cuales está compuesto por 8 moléculas de anfotericina B (Figura 2).

Esta estructura retiene a la droga, dentro de la bicapa liposomal en presencia de células humanas, tales como las células de los glóbulos rojos. Normalmente, estas células serían dializadas por la anfotericina B libre. Sin embargo, cuando el *AmBisome* se incuba con el hongo forma poros en ellos y mata al organismo. Este producto es al menos tan potente como agente fungicida como la droga libre a la misma concentración de anfotericina B, aunque su acción es más lenta.

En el mercado mundo mundial existen otros dos productos comerciales²⁹⁻³⁰ denominados *Amphocil* y *Abelcet* con características similares y una acción equivalente, aunque tienen formulaciones diferentes.

Todos estos productos de base lipídica de la anfotericina B son más grandes que los poros de filtración del riñón y por ello la droga tiene un acceso restringido a los túbulos sensibles de ese organismo. El liposoma *AmBisome* causa una menor toxicidad aguda (e.g. escalofríos y fiebre), posiblemente porque liga a la anfotericina B más fuertemente que las otras formulaciones.

Diagnóstico y terapia del cáncer

El ¹¹¹In³⁺ encapsulado en liposomas se ha manufacturado como un agente de diagnóstico de tumores *in vivo*. Las pruebas realizadas en seres humanos indican que el producto comercial puede señalar tanto a la enfermedad secundaria (metástasis) como a la primaria. Funciona muy bien para varias clases de tumores sólidos en tejidos suaves y duros y posee una sensibilidad aceptable (i.e. la capacidad para detectar las células tumorales) y una especificidad extremadamente grande (i.e. la habilidad para distinguir entre células tumorales y otros tejidos)³¹. Estas propiedades lo constituyen en un candidato prometedor

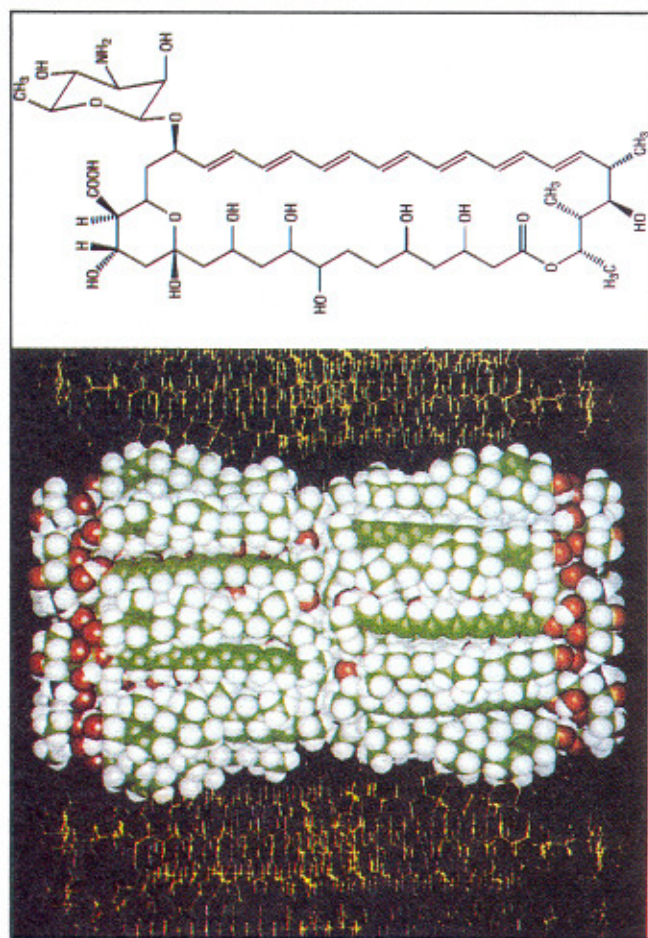


Figura 2. Ocho moléculas de anfotericina B pueden formar una disposición tipo barril con sus residuos hidroxílicos hidrofílicos en el interior. Un empaquetamiento de dos de estos cuerpos pueden expandir la bicapa de un liposoma, creando así un poro, cuya estructura se muestra en esta imagen generada computacionalmente. En color verde se muestran los átomos de carbono, en blanco, los hidrógenos, en azul oscuro, los nitrógenos, y en amarillo, los fosfolípidos y el colesterol. También se muestra la estructura de la anfotericina B.

para monitorear la recurrencia del cáncer luego de la cirugía o para seguir el curso del, tratamiento por quimioterapia. Aunque este producto puede detectar un amplio espectro de tipos de tumores, todavía no ha llegado a mostrar una velocidad tal de detección para alguna clase particular de tumor que ofrezca ventajas competitivas con respecto a los métodos de diagnóstico habituales.

La quimioterapia liposomal del cáncer parece ofrecer mejores perspectivas de cura que los agentes de diagnóstico con base en liposomas. Los liposomas brindan la ventaja potencial de la descarga concentrada de la droga sobre el sitio sólido del tumor, reduciendo su concentración en los blancos indeseables, tales como el riñón o el corazón y proveyendo una liberación sostenida de la droga en el tumor. La reducción de la concentración de droga en el riñón y el corazón es importante ya que la toxicidad en estos órganos a menudo limita drásticamente la dosis de los agentes quimioterapéuticos que se pueden suministrar al paciente con un grado razonable de seguridad.

Varios estudios realizados con ratones implantados con tumores de linfosarcoma mostraron que la encapsulación liposomática de la *daunorubicina*, una droga anticancerígena aprobada para su uso en seres humanos, aumentó la vida media de los ratones enfermos con respecto a otros ratones tratados con la misma dosis de la droga libre (Figura 3). Para la dosis más efectiva, la *daunorubicina* aumentaba la duración de vida de los ratones sin tratar en un 50%. La droga encapsulada liposomáticamente a la mitad de esa dosis era tan efectiva como la droga libre. Pero el ratón podía tolerar dosis conside-

blemente mayores de la droga en los liposomas que lo que podía recibir de la droga libre, presumiblemente porque la encapsulación concentraba la descarga de la droga sobre el sitio del tumor y alejada de los tejidos normales sensibles. Las mayores dosis eran efectivas, dejando a algunos animales liberados de los tumores. Ningún animal en el grupo de administración de la droga libre quedó liberado del tumor. Las pruebas llevadas a cabo hasta el presente con seres humanos con base en la daunorubicina encapsulada en hormonas son completamente consistentes con estos estudios con animales.

Aplicaciones en vacunas antivirales

Los liposomas también están siendo investigados para ser usados en el tratamiento de infecciones virales. Por ejemplo, con base en los resultados previos de investigación³² se ha incorporado el *LamB* (el receptor para el bacteriófago λ) en una bicapa liposómica³³. Mediante el empleo de la microscopía electrónica se demostró que el virus se une a los liposomas modificados e inyecta su ADN dentro de estas vesículas vacías. Luego de haber inyectado su ADN, el virus deja de ser infeccioso. Los investigadores midieron la velocidad de inyección del ADN incorporando bromuro de etidio dentro de la cavidad acuosa de los liposomas y monitoreando el acrecentamiento de la fluorescencia a medida que este flúoróforo se une al ADN inyectado.

También se ha investigado una estrategia similar para el tratamiento de enfermos de SIDA³⁴. En este caso se están usando los liposomas como transportadores de proteínas CD4 hacia la hoja externa de las membranas celulares de los glóbulos rojos.

Esta proteína es el blanco sobre la superficie celular del virus de inmunodeficiencia Humano (HIV), el cual causa el SIDA. Se ha propuesto que cuando estas células se inyectan en un paciente, cualquier HIV se debería ligar y fundir con las células modificadas de los glóbulos rojos. Como estas células no tienen núcleo, el proceso debería efectivamente inactivar al virus.

Los liposomas están siendo investigados como adyuvantes (intensificadores de la inmunogenicidad antigénica) para vacunas. Los antígenos asociados con los liposomas aumentan la producción de anticuerpos y pueden activar células específicas del sistema inmune para combatir a las infecciones de un modo más efectivo.

Terapia genética

Los liposomas pueden transportar al ADN hacia las células para producir la terapia genética. Aunque la ma-

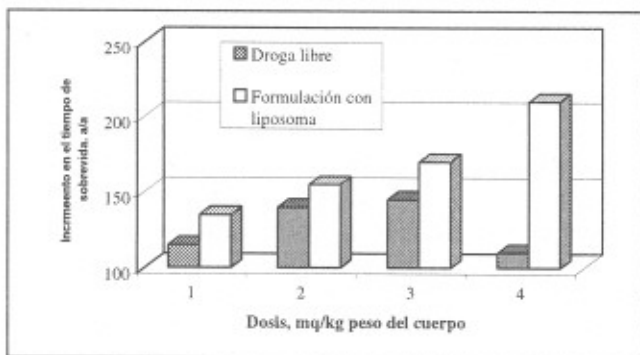


Figura 3. Los ratones con tumores implantados y tratados con daunorubicina encapsulada en liposomas viven un tiempo substancialmente mayor que aquellos tratados con la droga libre. Para dosis altas, a las cuales la droga libre no se puede emplear debido a sus efectos laterales, el producto encapsulado en liposoma aproximadamente dobla el tiempo de sobrevivencia media y también deja a algunos animales libres de tumores.

por parte de los experimentos emplean uno de los varios virus modificados para transportar ADN nuevo a través de la membrana celular, algunas pruebas clínicas en curso de desarrollo actual recurren a los liposomas para liberar el ADN dentro de las células a fin de tratar enfermedades tales como la fibrosis quística³⁵ y el cáncer³⁶. Los liposomas son agentes liberadores prometedores a causa del uso extendido de los virus que, no importa cuan desactivados se encuentren, pueden generar complicaciones indeseables. También se están probando otras aproximaciones, incluyendo la inyección directa del ADN desnudo³⁷ y una variedad de materiales de descarga catiónica diseñados para neutralizar la gran carga negativa del ADN a fin de facilitar su entrada dentro del citoplasma celular y, subsecuentemente, dentro del núcleo³⁸.

En el año 1983 se encontró evidencia para la expresión *in vivo* de la insulina de rata luego de la administración intravenosa del gen encapsulado en el liposoma para esta proteína en ratas normales³⁹. En 1987 se descubrió que los liposomas que contienen ciertos lípidos catiónicos, tal como el ion N-(1,2,3-dioleiloxi-propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) promueve el pasaje del ADN hacia las células, donde puede ser insertado en el núcleo, correctamente transcriptas en el ARN mensajero, y expresado como proteína⁴⁰. Este descubrimiento condujo a una formulación comercial que contiene liposomas catiónicos para la transfección de células en cultivos.

Otros trabajos adicionales han demostrado que otros lípidos catiónicos pueden ser aún más efectivos que el DOTMA. Así, se constató que las variaciones en la longitud y el grado de insaturación de la cadena lateral lipídica, la naturaleza de los grupos unidos al nitrógeno cuaternario y aún la identidad del contraión pueden tener grandes efectos sobre la eficiencia de la transferencia del gen a las células en cultivo⁴¹. También se ha demostrado la eficiente transferencia genética a las células en cultivo mediante el empleo de lípidos poliamínicos³⁸. Recientemente se informó acerca de estudios sobre el mecanismo por el cual estos lípidos catiónicos acrecientan el transporte del ADN a través de las membranas celulares⁴². Se halló que los lípidos aniónicos en la membrana celular pueden disociar el complejo ADN-lípido catiónico luego que éste entra en la célula.

Sin embargo, la mayor parte de los lípidos catiónicos diacíclicos estudiados no han mostrado ser eficientes para la expresión de genes *in vivo*. En efecto, la inyección intramuscular directa del ADN desnudo a menudo es más eficiente que estos complejos de base lipídica³⁶. Asimismo, los lípidos catiónicos son tóxicos. Se pudo demos-

trar que los grupos funcionales cargados que se agregan a las componentes de las membranas, tal como el colesterol, pueden aumentar la eficiencia de transfección y reducir la toxicidad⁴³.

Otra estrategia importante que está siendo estudiada para la descarga *in vivo* de genes es el empleo de dendrímeros, que son estructuras catiónicas ramificadas construidas por generaciones sucesivas de polimerizaciones. Esta particular clase de supermoléculas se descubrieron hace ya más de diez años y poseen una estructura bien caracterizada que depende del número de generaciones de etapas de polimerización.

La real motivación que subyace detrás de todos estos desarrollos es la búsqueda de vectores no virales para la terapia genética. Se necesitan vías para descargar un gen en las células objeto apropiadas, donde éste pueda reemplazar al gen defectuoso. Debido a un simple gen defectuoso, por ejemplo, los pacientes con fibrosis quística no pueden sintetizar una proteína que forma un canal para el transporte iónico a través de la membrana celular de los pulmones. Algunos estudios recientes han mostrado que cuando las copias del gen apropiado complejado con ciertos lípidos catiónicos se instalan directamente en los pulmones del ratón, el transporte iónico deficitario se puede corregir. Así, se han construido vectores de expresión plasmídicos (arrollamientos circulares de ADN que se pueden replicar independientemente del cromosoma) que pueden generar altos niveles de expresión del gen transportado. Se han evaluado muchos lípidos catiónicos para testear sus respectivas capacidades para mediar la transferencia genética con alta eficiencia en las células pulmonares objeto en ratones⁴⁵. Los resultados parecen demostrar que estos complejos de ADN-lípidos se comportan con un nivel de eficiencia comparable a los vectores adenovirales.

Hasta aquí, estos experimentos *in vivo* han usado aplicaciones directas de los complejos ADN-lípidos en los tejidos objeto. Las formulaciones que son marcadamente activas para la transfección usualmente no van al lugar deseado cuando se inyectan por vía intravenosa. Para poder llegar a concretar el objetivo de la descarga selectiva de ADN con la inyección sistémica, las lecciones recogidas acerca del desarrollo de los liposomas deben ser combinadas con la comprensión emergente de los mecanismos acerca de cómo el ADN penetra las células de las membranas.

Conclusiones

Los liposomas ofrecen una base muy interesante y potencialmente valiosa para poder llegar a producir cambios

extraordinarios en la farmacología específicamente dirigida. La mayor parte de las aplicaciones clínicas de la descarga liposomal de drogas todavía se encuentra en sus primeras instancias de desarrollo. Sin embargo, el empleo exitoso en la terapia de enfermedades por hongos así como el diagnóstico y terapia cancerígena parecen mostrar algunas de las enormes posibilidades para este tipo de aproximación. La unión de los receptores virales a los liposomas también pueden abrir otros nuevos campos de la terapia direccionalizada con especificidad para células infectadas viralmente y para la terapia genética. La capacidad artesanal de generar estructuras sintéticas tipo celular junto con la sofisticada funcionalidad creciente seguramente formará una parte importante de la tecnología futura disponible para las aplicaciones en el diagnóstico y la terapia de enfermedades ⁴⁶.

Referencias

1. D.D. Lasic, *La Recherche*. 1989. 20: 904.
2. X. Michalet, F. Jülicher, B. Fourcade, U. Seifert y D. Bensimon, *La Recherche* 1994 25: 1012.
3. A.D. Bangham, M. M. Standish y J. C. Watkins, *J Mol. Biol.* 1965 13: 238.
4. G. Sessa y G. Weissmann, *J. Lipid Res.* 1968 9: 310.
5. V K. Miyamoto y W. Stoekenius, *J. Membr. Biol.* 1973 4: 252.
6. G. Gregoriadis y B. Ryman, *Eur. J. Biochem.* 1972 24: 485.
7. G. Gregoriadis, L. P. Swain y A. S. Tavit, *Lancet* 1974 1: 1313.
8. T.D. Heath, R.T. Fraley y D. Papahadjopoulos, *Science* 1980 210: 539.
9. R. M. Straubinger, K. Hong, D. S. Friend y D. Papahadjopoulos, *Cell* 1983 32: 10691.
10. K. J. Hwang y M. R. Mauk, *Proc., Natl. Acad. Sci. USA* 1977 74: 4991.
11. M. R. Mauk y R. C. Gamble, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979 76: 765.
12. C. F. Meares, R. G. Bryant, J. D. Baldeschwieler y D. A. Shirley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1969 64: 1155.
13. F. G. Bonte y R. Juliano, *Chem. Phys. Lipids* 1986 40: 359.
14. T. M. Allen y A. Chonn, *FEBS Lett.* 1987 223: 42.
15. D. Papahadjopoulos, T. M. Allen, A. Gabizon, E. Mahew, K. Mathay, S. K. Huang, K. -D. Lee, M. C. Woodle, D. D. Lasic, C. Redemann y F. J. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991 88: 11460.
16. D. Aragnol y L. D. Leserman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986 83: 2699.
17. M. R. Mauk, R. C. Gamble y J. D. Baldeschwieler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980 77: 4430.
18. J. D. Baldeschwieler, *Ann. NY Acad. Sci.* 1985 446: 349.
19. G. Scherphof, H. Morselet, J. Regts y J. C. Wilschut, *Biochem. Biophys. Acta* 1979 556: 196.
20. R. T. Proffitt, L. E. Williams, C. A. Presant, G. W. Tin, J. A. Uliana, R. C. Gamble y J. D. Baldeschwieler, *J. Nucl. Med.* 1983 24: 45.
21. Idem, *Science* 1983 220: 502.
22. J. W. Nichols y D. Deamer, *Biochem. Biophys. Acta* 1976 455: 269.
23. M. R. Mauk y R. C. Gamble, *Anal. Biochem.* 1979 94: 302.
24. L. D. Mayer, M. B. Bally, M. J. Hope y P. R. Cullis, *Chem. Phys. Lipids* 1986 40: 333.
25. G. López-Berestein, *J. Infect. Dis.* 1985 151: 704.
26. J. P. Adler-Moore, S. M. Chiang, A. Satorius, D. Guerra, B. McAndrews, E. J. McManus y R. T. Proffitt, *J. Antimicrob. Chemoter.* 1991 28 (Suppl. B) 63.
27. O. Ringden, F. Meunier, J. Tollemar, P. Ricci, S. Tura, E. Kuse, M. A. Viviani, N. C. Gorin, J. Klastersky, P. Fenaux, H.G. Prentice y G. Ksionski, *J. Antimicrob. Chemoter.* 1991 28: (Suppl. B) 73.
28. G. Fujii, en *Vesicles*, M. Rosoff, Ed., Marcel Dekker, New York, 1996: 491-526.
29. T. F. Patterson, P. Minitier, J. Dijkstra, F. C. Szoka, J. L. Ryan y V. T. Andriole, *J. Infect. Dis.* 1989 159: 171.
30. A. S. Janoff, L. Boni, M. C. Popescu, S. R. Minchey, P. R. Cullis, T. D. Madden, T. Taraschi, S. M. Gruner, E. Shyamsunder, M. W. Tate, R. Mendelsohn y D. Bonner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988 85: 6122.
31. C. A. Presant, R. T. Proffitt, A. F. Turner, L. E. Williams, D. Winson, J. L. Werner, P. Kennedy, C. Wiseman, K. Gala, R. J. McKenna, J. D. Smith, S. A. Bouzagloa, R. H. Callahan, J. D. Baldeschwieler y R. J. Crossley, *Cancer* 1988 62: 905.
32. C. A. Roessner y G. M. Ihler, *J. Biol. Chem.* 1986 261: 386.
33. S. L. Novick y J. D. Baldeschwieler, *Biochemistry* 1988 27: 7919.
34. C. Nicolau, P. F. Tosi, T. Arvinte, Y. Monneimne, A. Cudd, L. Sneed, C. Madoulet, B. Schulz y R. Barhonnii, *Prog. Clin. Biol. Res.* 1990 343: 147.
35. N. J. Caplen, E. W. Alton, P.G. Middleton, J. R. Dorin, B. J. Stevenson, X. Gao, S. R. Durban, P. K. Jeffery, M. E. Hodson, C. Coutelle, L. Huang, D. J. Porteous, R. Williamson y D. M. Geddes, *Nat. Med (New York)* 1995 1: 39.
36. G. L. Nabel, E. G. Nabel, Z. Y. Yang, B. A. Fox, G. E. Plautz, X. Gao, L. Huang, S. Shu, D. Gordon y A. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993 90: 11307.
37. J. A. Wolff, M. E. Dowty, S. Jiao, G. Repetto, R. K. Berg, J. J. Ludke, P. Williams y D. B. Slaughterback, *J. Cell. Sci.* 1992 103: 1249.
38. J. P. Behr, *Bioconjugate Chem.* 1994 5: 382.
39. C. Nicolau, A. LePape, P. Soriano, F. Fargete y M. Fargete y M. F. Johel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983 80: 1068.
40. P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. R. Ringold y M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987 84: 7413
41. R. W. Malone, P. Felgner e I. Verma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

41. **R. W. Malone, P. Felgner e I. Verma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989 86: 6077.**
42. **O. Zelphati y F. C. Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996 93: 11493.**
43. **X. Gao y L. Huang, *Biochemistry* 1996 35: 1027.**
44. **D. A. Tomalia, H. Baker, J. R. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryger y P. Smith, *Polym. J.* 1985 17: 117.**
45. **P. L. Felgner, Y. J. Tsai, L. Sukju, C. J. Wheeler, M. Manthorpe, J. Marschall y S. H. Cheng, *Ann. NY Acad. Sci.* 1995 772: 126.**
46. **J. D. Baldeschwieler y P. G. Schmidt, *Chemiec* 1997, 34.**