

DIFUSIÓN DE FOSCARNET VEHICULIZADO EN LIPOSOMAS

C. Claro, M.J. Lucero, L. López, R. Ruiz, M.J. León

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
C/ Profesor García González s/n. Sevilla.

Introducción

El foscarnet (F) es un agente antiviral con actividad frente al grupo de los ADN-virus incluyendo el herpes simple tipos 1 y 2, varicela zoster y el citomegalovirus (CMV), así como el VIH (1). Este fármaco es un análogo del pirofosfato cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición selectiva de la enzima ADN-polimerasa de los herpesvirus, así como de la transcriptasa inversa y replicación del VIH (2). La administración intravítrea de fármacos anti-CMV es considerada como alternativa en pacientes inmunodeprimidos que no toleran o rechazan tratamiento sistémico (3).

Para mantener los niveles terapéuticos en retina, es necesario que la administración sea repetida (4), lo que conlleva múltiples heridas en lente o retina (5).

Como alternativa se vehiculiza el foscarnet en liposomas, de ésta forma se consigue una liberación continuada del principio activo en un lugar concreto. Sería una forma no invasiva de administrar altas dosis de fármaco, distanciar en el tiempo la frecuencia de la administración, así como reducir la toxicidad de éste.

El presente trabajo tiene como objetivo el estudio de difusión *in vitro* del F libre y vehiculizado en liposomas, utilizando como donador vítreo aislado de conejo.

Materiales y Métodos

1. Elaboración de liposomas

Se han elaborado 2 lotes de liposomas LUV por el método de evaporación en fase reversa (REV) (6). Para ello se han utilizado lecitina de soja

(ICN Biomedical Inc.), cloroformo:éter dietílico (2:1), 41.3 mg de foscarnet (Laboratorios Astra, Suecia) y 1,6 ml de FoscaVir® (24 mg/ml de foscarnet, Laboratorios Astra, Suecia), con el fin de que exista un total de 80 mg de fármaco. Por último, uno de los lotes se ha sometido a liofilización (Telstar. Mod. Cryodos-45), en condiciones de vacío de $2.5 \cdot 10^0$ mB y temperatura -102.4°C durante 24 horas.

Pasado este tiempo se rehidrata con 1.0 ml de solución de NaCl al 0.9 % p/v y se agita hasta obtener una solución lechosa.

Una vez elaborados los distintos lotes se ha procedido a cuantificar el % de foscarnet encapsulado.

2. Técnica analítica

Se ha utilizado un HPLC (Gilson Medical Electronics), con columna Lichospher 100 RP-18 ($5 \mu\text{m}$, 125×4 mm, Merck) y un detector electroquímico (Coulchem II) con dos células analíticas 5011 y una *guard* 5020. El potencial aplicado ha sido +500, +900, +990 mV. La fase móvil ha sido elaborada a pH 5.8 con tampón fosfato y metanol (75:25), tetrahexilamonio sulfato (1 mM) y ácido pirofosfórico (0.02 mM). Como estándar interno se ha utilizado hidroclorotiazida. El *loop* ha sido de 20 μl y la velocidad de flujo de 0.7 ml/min. El límite de detección ha sido 10 $\mu\text{g/ml}$.

3. Ensayo de difusión *in vitro*

Se han utilizado células de difusión de Franz tipo 400. En el compartimento donador se han colocado muestras de F en solución de NaCl al

342 VI Congreso SEFIG y 3^{as} Jornadas TF

0.9 % p/v (Foscavir[®])(SF) y de liposomas de F (LF); por otra parte, se ha depositado en el compartimento donador, humor vítreo recién extraído, procedentes de conejos pigmentados (peso medio: 3.03 Kg), al que se le ha inyectado 0.05 ml de Foscavir[®] (VF) y de liposomas liofilizados con F (LVF). El compartimento receptor ha contenido 14.5 ml de solución de NaCl al 0.9 % p/v.

Ambos compartimentos han estado separados por una membrana hidrófila de nitrato de celulosa (*Whatman[®] International Ltd, Maidstone, England*), de 47 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro, previamente inmersa en solución de NaCl al 0.9 % p/v durante 1 hora.

Durante el ensayo se ha mantenido una temperatura aproximada de 37 °C gracias a la recirculación de agua a través de una doble cámara de cristal de la célula.

En los tiempos prefijados (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 h) se ha tomado del receptor una alícuota de 0.5 ml con posterior reposición del volumen indicado.

4. Estudio del ajuste cinético

Para la elección del modelo de cesión, se ha utilizado el "criterio de información de Akaike", el cual seleccionará la función que mejor ajusta los datos experimentales, cuya ecuación se corresponde con:

$$AIC = n \cdot \ln SSQ + 2p$$

a. Para una cinética de orden uno se han utilizado las siguientes ecuaciones:

$$\ln \frac{(C_1 - C_2)_{ti}}{(C_1 - C_2)_o} = -PA \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} \right) t_i \quad (1)$$

$$P = \frac{D \cdot K_p}{h} \quad (2)$$

Teniendo en cuenta que los volúmenes en los compartimentos son distintos;

- V_1 : volumen compartimento donador
- V_2 : volumen compartimento receptor
- C_1 : concentración en el compartimento donador
- C_2 : concentración en el compartimento receptor
- A : área disponible para la difusión
- K_p : coeficiente de reparto (0,436)
- h : distancia difusional (0,0145 cm)
- D : coeficiente de difusión
- P : coeficiente de permeabilidad

b. Para una cinética de Higuchi, característica de difusión a través de membrana, se utiliza la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{2AC_0}{h} \sqrt{\frac{Dt}{P}}$$

Donde Q : cantidad del F, A : área disponible para la difusión, h : distancia difusional.

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos se han expresado en porcentajes de F detectado en el receptor frente a los distintos tiempos predeterminados.

Se han comparado los valores obtenidos en las células de difusión con fármaco en solución salina, con el encapsulado en liposomas y posteriormente la difusión desde vítreo.

Se observa en la Figura 1 que el perfil del F en solución (SF) presenta una difusión rápida hasta las 2 horas y posteriormente se mantiene en estado estacionario. Por su parte, el F en LF comienza a difundir de igual manera hasta 1 hora, momento en que se alcanzan niveles constantes de F difundido.

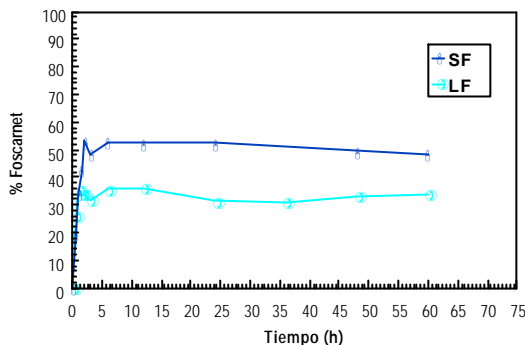


Figura 1.- % F difundido para los tiempos y muestras indicados.

La figura 2, representa una difusión desde vítreo donde se observa una mayor diferencia entre los perfiles de VF y LVF. La curva correspondiente al F libre (VF), libera rápidamente hasta más de un 90% de la dosis quedando en el donador niveles de F por debajo de los terapéuticos (4).

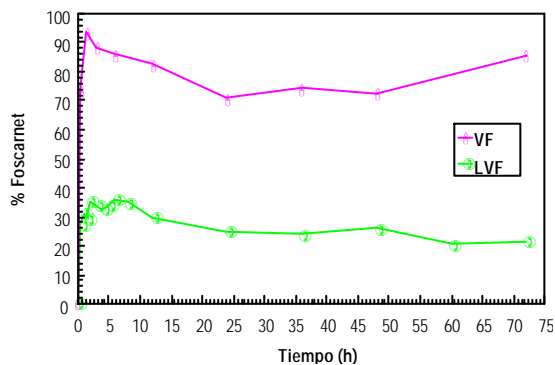


Figura 2.- % F difundido desde vítreo para los tiempos y muestras indicados.

En cambio, el F encapsulado, LVF, es liberado más lentamente desde el vítreo y se incrementan los niveles hasta el 37% manteniéndose durante las primeras 8 h. Transcurrido este tiempo disminuyen los niveles probablemente porque no quede más F libre y el resto permanece incluido en los liposomas, ya que la tasa de encapsulación obtenida es del 63 %. Para cada uno de los ajustes a las distintas cinéticas, los valores de **AIC** obtenidos se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Valores obtenidos tras aplicar el criterio de AkaiKe.

AKAIKE	SF	LF	VF	LVF
Orden 0	21.325	12.534	19.324	35.500
Orden 1	9.420	0.000	-22.735	-17.667
Higuchi	57.615	20.148	53.641	96.773

De estos datos se observa que el mejor ajuste corresponde a la función de **Orden uno**.

De la aplicación de la cinética de orden uno, los parámetros de difusión se muestran en la tabla 2. Por otra parte, aplicando las ecuaciones 1 y 2 se obtienen los coeficientes de difusión y de permeabilidad.

Tabla 2. Parámetros obtenidos en la cinética de orden uno (Kd: es la constante de disolución, Fd: es la fracción de dosis disuelta, T_{1/2}: semivida de disolución).

	SF	LF	VF	LVF
Dosis (mg)	80.0	80.0	1.2	2.66
Kd (h ⁻¹)	0.574	1.946	4.707	5.432
Fd (%)	66.66	53.74	89.34	34.10
T _{1/2}	1.21	0.36	0.21	0.20
D(cm ² /h)	3.93E-3	1.11E-3	7.815E-4	4.16E-4
P (cm/h)	0.118	0.033	0.0235	0.012

Por otra parte, los resultados obtenidos a partir de la ecuación de Higuchi son los que se recogen en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros obtenidos en la cinética de Higuchi.

	SF	LF	VF	LVF
D (cm ² /h)	0.122	2.3E-2	2.0E-2	2.7E-3
P (cm/h)	3.67	0.691	0.592	0.0824
Kp	0.436			

A pesar que ambos criterios, por los resultados obtenidos, justifican los perfiles de liberación del F, en este caso, se considera que el vítreo no se comporta como matriz reguladora de la liberación del F, como se podría observar en los ensayos *in vivo* (5). El vítreo, al aislarlo, debido a la manipulación a que es sometido, previsible

pierde su estructura y las propiedades de reservorio (7), por tanto, la liberación se justificará basándose en los datos obtenidos a partir de la cinética de orden uno.

La rápida liberación del F en los primeros intervalos de tiempo, puede ser justificada por el efecto del gradiente de concentración, fenómeno espontáneo que tiende a igualar concentraciones a ambos lados de la membrana.

El tratamiento matemático de los datos, muestra que los D del F libre, tanto diluidos en solución de NaCl al 0.9 % p/v como en el vítreo, son mayores que los del F encapsulado, como consecuencia, mayor difusión, favorecida por los valores de P que también son más altos.

Comparando los perfiles de F libre, a la Fd de FV es mayor que la de SF, probablemente favorecido por la desestructuración del vítreo, así como por la diferencia existente en el contenido de los compartimentos, vítreo en donador y solución salina en receptor. Pese a ello el vítreo ejerce un efecto limitante al paso del F, ya que la permeabilidad del F, es menor.

En las muestras de LVF, los liposomas que encapsulan el F se han liofilizado para mejorar su estabilidad (7) así como la administración en el vítreo, de esta forma se puede retardar la biodegradación de los liposomas, la disponibilidad del F en el medio, así como su disolución, por lo que los valores de Fd como $T_{1/2}$ son pequeños. En ensayos *in vivo*, los liposomas liofilizados difunden rápidamente, por lo que la difusión se ve afectada por factores biológicos que *in vitro* no son detectables.

De los resultados obtenidos *in vitro* se puede concluir que la encapsulación del F en liposomas favorece la liberación retardada del fármaco.

La liberación retardada se puede ver favorecida por la administración de los liposomas liofilizados en el vítreo aislado.

Bibliografía

1. J. García, M.J. Lucero, M.J. León, L.F. López, Ciec. Pharm., 7, 209, (1997).
2. Oberg B., Chrisp P., Crumpacker CS., Field HJ, Bergdahl S, Foscarnet: un nuevo concepto en antivirales , capítulo 1º, José Mª Gatell, José Mensa, Laura Zamora, Editorial:Antares, Barcelona, 1994.
3. L.F. López, R. Ruiz, M.J. Lucero, E. Cordero, M.T. Pasto J. Márquez, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 756, (2000).
4. L. F López, M. T. Pastor, R. Ruiz, E. Cordero, A. Uceda, C.M. Claro, M.J. Lucero. Investigative Ophthalmology & Visual Sciences, 42, 5, (2001)4.
5. V Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery. Sevilla, 2002.
6. G.A. Peyman, H.C. Charles, K.R. Liu, B. Khoobehi and M. Niesman. International Ophthalmology. 12, 175, (1988).
7. GV. Betageri, S.A. Jenkins, D. L. Parsons. Liposome drug delivery systems. Technomic Publishing, Lancaster, 1993.