

Plan de Gestión de Datos

INFORMACION SOBRE EL PROYECTO

1. – Título del Proyecto

- Título del Proyecto (en castellano)

Estudio, caracterización y evaluación de formulaciones liposomales de Anfotericina B

- Título del Proyecto (en inglés)

Study, characterization and evaluation of liposomal formulations of Amphotericin B

-Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen

El tratamiento de las enfermedades fúngicas constituye un aspecto muy relevante de la salud pública, en particular en los países en vías de desarrollo como la Argentina. Una terapia de probada eficacia para tratar infecciones fúngicas invasivas consiste en la administración intravenosa de Anfotericina B (AmB), sin embargo, este antibiótico presenta una ventana terapéutica reducida debido a su toxicidad y es por ello que desde hace algún tiempo se lo utiliza en formulaciones liposomales. La efectividad de estas formulaciones resulta ser muy dependiente no solo de la composición lipídica sino también de su técnica de producción debido a cambios fisicoquímicos todavía no esclarecidos que ocurren en el proceso de fabricación. A pesar de que AmB se utiliza clínicamente desde hace varias décadas, el mecanismo de acción a nivel molecular sigue siendo difícil de dilucidar, y se han propuesto varios modelos. AmB no solo se utiliza por vía intravenosa, sino también para el tratamiento de infecciones dérmicas, como la leishmaniasis cutánea. Sin embargo, no existen en el mercado local formulaciones disponibles de Anfotericina B para uso dérmico.

Este proyecto se presenta como una colaboración interdisciplinaria entre un grupo de investigación de la FBCB con amplia trayectoria en diversas metodologías de estudio de vesículas lipídicas y membranas biológicas utilizando diferentes técnicas espectroscópicas; y una empresa local (Lipomize SRL) con amplia trayectoria en el desarrollo de formulaciones liposomales. Tanto la FBCB como la empresa Lipomize SRL cuentan con el equipamiento necesario para llevar a cabo los objetivos propuestos. Se plantean dos objetivos principales: 1) la caracterización de los procesos fisicoquímicos que ocurren en las diferentes etapas de producción de una formulación liposomal de Anfotericina B para administración intravenosa que Lipomize SRL ya ha conseguido formular; y 2) la formulación y caracterización fisicoquímica de un fármaco de Anfotericina B para uso dérmico. Para el desarrollo de esta segunda parte del proyecto se tiene planeado convocar a una pasantía de investigación (formación extracurricular) y eventualmente un trabajo de tesina de Licenciatura en Biotecnología.

Sobre la formulación liposomal de uso intravenoso (LIV) nos proponemos determinar, mediante EPR (Resonancia paramagnética electrónica) con marcadores de espín liposolubles y espectroscopía UV-Vis y de fluorescencia, la dinámica de agregación de los monómeros de AmB tanto en solución como aquellos que se encuentran incorporados a la bicapa lipídica de los liposomas, y estudiar el efecto del fármaco sobre la membrana eritrocitaria en cuanto a su permeabilidad y a su ordenamiento lipídico

En cuanto a la formulación liposomal de uso dérmico (LUD), nos proponemos ensayar una serie acotada de formulaciones lipídicas acordes a la vía de administración del fármaco en cuestión, y evaluar las características relevantes de cada una de ellas; caracterizar mediante DLS (dispersión de luz dinámica), espectroscopía de EPR, UV-Vis y fluorescencia los productos intermedios en cada etapa de producción con el objetivo de entender los procesos fisicoquímicos involucrados; y establecer las condiciones experimentales adecuadas para llevar adelante el proceso de gelificación en la etapa final del proceso de producción

De manera prospectiva, y dependiendo de los resultados preliminares obtenidos, nos proponemos también un estudio in vitro del mecanismo de acción del fármaco en cuanto a su interacción con la membrana plasmática de la célula diana, evaluando tanto su efectividad como su toxicidad. Los resultados obtenidos serán presentados en reuniones científicas nacionales e internacionales y serán publicación en revistas científicas con referato.

-Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen

The treatment of fungal diseases constitutes a very relevant aspect of public health, particularly in developing countries such as Argentina. A proven effective therapy to treat invasive fungal infections consists of the intravenous administration of Amphotericin B (AmB), however, this antibiotic has a reduced therapeutic window due to its toxicity and that is why it has been used in liposomal formulations. The effectiveness of these formulations turns out to be very dependent not only on the lipid composition but also on their production technique due to still unclarified physicochemical changes that occur in the manufacturing process. Although AmB has been used clinically for several decades, the mechanism of action at the molecular level remains difficult to elucidate, and several models have been proposed. AmB is not only used intravenously, but also for the treatment of dermal infections, such as cutaneous leishmaniasis. However, there are no available formulations of Amphotericin B for dermal use in the local market.

This project is presented as an interdisciplinary collaboration between a FFCB research group with extensive experience in various methodologies for studying lipid vesicles and biological membranes using different spectroscopic techniques; and a local company (Lipomize SRL) with extensive experience in the development of liposomal formulations. Both the FFCB and the company Lipomize SRL have the necessary equipment to carry out the proposed objectives.

Two main objectives are proposed: 1) the characterization of the physicochemical processes that occur in the different stages of production of a liposomal formulation of Amphotericin B for intravenous administration that Lipomize SRL has already managed to formulate; and 2) the formulation and physicochemical characterization of an Amphotericin B drug for dermal use. For the development of this second part of the project, it is planned to call for a research internship (extracurricular training) and eventually a Bachelor's thesis in Biotechnology.

Regarding the liposomal formulation for intravenous use (LIV), we propose to determine, by means of EPR (Electronic Paramagnetic Resonance) with liposoluble spin markers and UV-Vis and fluorescence

spectroscopy, the aggregation dynamics of AmB monomers both in solution and those that are incorporated into the lipid bilayer of the liposomes, and to study the effect of the drug on the erythrocyte membrane in terms of its permeability and lipid organization.

Regarding the liposomal formulation for dermal use (LUD), we propose to test a limited series of lipid formulations according to the route of administration of the drug in question, and evaluate the relevant characteristics of each of them; characterize by DLS (dynamic light scattering), EPR, UV-Vis and fluorescence spectroscopy the intermediate products at each production stage with the aim of understanding the physicochemical processes involved; and establish the appropriate experimental conditions to carry out the gelation process in the final stage of the production process.

Prospectively, and depending on the preliminary results obtained, we also propose an in vitro study of the mechanism of action of the drug in terms of its interaction with the plasma membrane of the target cell, evaluating both its effectiveness and its toxicity. The results obtained will be presented at national and international scientific meetings and will be published in refereed scientific journals.

-Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en castellano)

Anfotericina B liposomal Leishmaniasis cutanea Espectroscopía de EPR

- Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en ingles)

Liposomal Amphotericin B cutaneous leishmaniasis EPR Spectroscopy

2 – Datos del Director/ar del Proyecto

- Nombre y Apellido

Pablo Marcelo RODI

- Unidad Académica

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB)

- Teléfono oficial de contacto

+54 342-457 5213

-Teléfono movil de contacto

+54 342-6980 445

-E-mail del Director/a del Proyecto

pblorodi@gmail.com, prodi@fcb.unl.edu.ar

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

-Describa la toma de muestras / datos a realizar

Se producirán liposomas (LIV) compuestos de DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol), HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada), Colesterol y AmB (Anfotericina B). Para este caso se pretende desarrollar y optimizar un proceso para la producción a escala laboratorio de una formulación genérica de Ambisome (Gilead Science, USA), golden *estándar* para este ingrediente activo desde 1996, no habiendo a la fecha un producto comercial de igual eficacia y toxicidad.

Se producirán liposomas (LUD) teniendo en cuenta la vía de administración deseada para este producto, para este caso los liposomas tendrán una composición lipídica compatible con los requerimientos de elasticidad y fluidez de las bicapas lipídicas.

Ambas formulaciones, inyectable y de uso dérmico serán elaboradas de acuerdo a las técnicas de nanoprecipitación previamente desarrolladas por la Lipomize

Sobre los productos de cada etapa intermedia de producción y sobre los productos liposomales terminados se llevarán a cabo

Estudios de espectroscopía de EPR utilizando marcador de espín (n-SASL). Se obtendrán espectros de onda continua, se evaluará el parámetro de orden correspondiente, lo cual permitirá establecer el orden dinámico de la bicapa lipídica y las características de los complejos AmB-lípido formado en ella.

Estudios de espectroscopía UV-Vis tanto de la AmB en solución como la que se encuentre asociada a la bicapa lipídica de los liposomas. Se obtendrán espectros de absorción UV-VIs en entre 300 y 500 nm. Los parámetros cuantificables serán la posición del pico principal de absorbancia y la relación de alturas de pico entre el pico de monómero residual (que es dominante en metanol) y la absorbancia del pico principal. Esto permitirá establecer el grado de auto-asociación de AmB en la muestra.

Estudios de espectroscopía de fluorescencia: Se obtendrán espectros de fluorescencia de las muestras de AmB (en solución o como parte de una formulación liposomal) en un rango de 590 a 700 nm con una longitud de onda de excitación de 390 nm. Esto permitirá cuantificar el proceso de autoasociación del fármaco relacionado con el secuestro del cromóforo de polieno dentro de un ambiente más hidrófobo y la estructura vibrónica de polieno de la AmB monomérica que colapsa en una banda desplazada hacia el azul, típica de estructuras agregadas.

Determinación del radio hidrodinámico medio de liposomas mediante DLS: Tanto para la formulación inyectable como la de uso dérmico se determinarán los tamaños de partícula

Generación del producto final mediante agregado de agentes gelificantes: Para el caso de la formulación de uso dérmico se procederá a la gelificación a partir del agregado de goma xántica o Carbopol 940 utilizando trietanolamina como agente entrecruzante. Se evaluarán las propiedades de físicas del gel obtenido, así como su estabilidad en el tiempo.

Determinación de toxicidad mediante liberación de potasio en Eritrocitos: La toxicidad de las formulaciones se evaluará mediante el ensayo de liberación de potasio in vitro utilizando glóbulos rojos (RBC). Alternativamente se determinará el grado de hemólisis de las suspensiones de RBC bajo la acción del producto liposomal. Se obtendrán valores de % de liberación de Potasio y/o % de hemólisis correlacionados con diferentes concentraciones del producto liposomal. De esta manera se establecerá in vitro los niveles mínimos de concentración aceptables para el diseño de tratamientos in vivo.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC): Se utilizará un ensayo de dilución de microtitulación para determinar las MIC para la levadura *Candida albicans* (CP 620). Las células de levadura se prepararán mediante subcultivo diario en caldo de dextrosa de Sabouraud durante 2 días, sedimentación y enjuague dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,2. Los sedimentos finales se resuspendieron en PBS, las células se contarán con una cámara de Neubauer o por cultivo en medio sólido, y la concentración de las suspensiones de



blastosporas se ajustarán con RPMI-MOPS para. La viabilidad de las blastosporas se evaluará colocando por cultivo en placas de agar inhibidor de moho, seguido de incubación a 35°C durante 24 a 48 h. Se prepararán series de diluciones dobles de cada formulación liposomal en RPMI-MOPS y se dispensarán alícuotas de 100 µl de cada dilución de fármaco en pocillos por triplicado de una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos. Luego se dispensarán alícuotas del organismo de prueba en los pocillos apropiados. Se añadirá azul Alamar a todos los pocillos y la placa se incubará a 35°C durante 48 h. La CIM se determinará como la concentración más baja del fármaco que evita el desarrollo de un color rojo [53].

– Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad / ser de acceso público? (marque X)	
	NO
x	SI. Elija una de las opciones:
	Se solicita confidencialidad debido a que los resultados serán parte de una publicación científica en una revista especializada del área, para lo cual es necesario que los datos no hayan sido publicados con anterioridad.
– Período de Confidencialidad: Es el periodo durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El periodo máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad / serán de acceso público.	
Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con “X”.	
	1 (UN) año
	2 (DOS) años
	3 (TRES) años
	4 (CUATRO) año
x	5 (CINCO) años
	Otro.
	Motivos: