

NANOVEHÍCULOS DEL ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO (ALA) EN EL TRATAMIENTO FOTODINÁMICO DEL CÁNCER

J. Morrone⁽¹⁾, R. Gauna⁽¹⁾, V. Zannoni⁽¹⁾, G. Gola⁽²⁾, G. Di Venosa⁽³⁾, J. A. Ramírez⁽²⁾, A. Casas⁽³⁾, V. Defain⁽¹⁾
⁽¹⁾INTI Química, ⁽²⁾Departamento de Química Orgánica de la FCEN, UBA, ⁽³⁾Centro de Investigación sobre Porfirinas y Porphirias, CIPYP-CONICET
 mvd@inti.gov.ar

Introducción

La luz puede ser empleada para el tratamiento de tumores superficiales o de acceso por vía endoscópica por medio de la Terapia Fotodinámica (TFD). Se basa en el uso de fotosensibilizantes que al ser expuestos a la luz dan lugar a una serie de reacciones fotoquímicas. De esta manera, pueden destruirse selectivamente las células fotosensibilizadas.

Un fotosensibilizante endógeno importante es la Protoporfirina IX (PpIX), que se biosintetiza a partir de su precursor, el ácido 5-aminolevulínico (ALA). La administración de ALA en un tejido particular lleva a la acumulación de porfirinas, que en general es más pronunciada en células con alta actividad metabólica, tales como células tumorales.

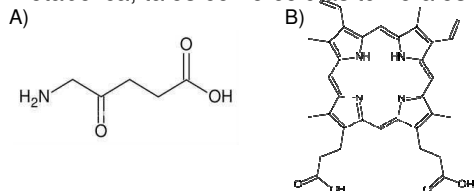


Figura 1. A) Estructura del ALA. B) Estructura de la Protoporfirina IX

A pesar de que el uso de ALA en TFD ha mostrado un gran potencial para tratamientos de células tumorales su eficacia se ve limitada por su naturaleza altamente hidrofílica, lo que lleva a una baja penetración en tejidos malignos. A pH fisiológico, el ALA es un zwitterión, lo cual limita su capacidad para atravesar las membranas celulares vía difusión pasiva, y puede resultar en una baja penetración y una distribución en los tejidos blanco no homogénea.

Objetivo

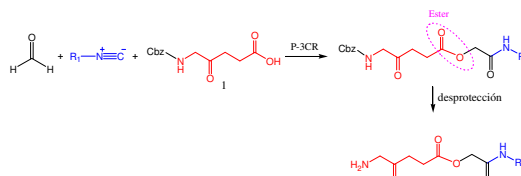
Sintetizar compuestos derivados del ALA mediante reacciones multicomponentes aumentando su lipofilidad y nanovehicularlos para mejorar su penetración en tejidos malignos blanco.

Descripción

Síntesis de derivados de ALA (dALA)

El Esquema 1 muestra como el ALA, con el grupo amino protegido, participa de una reacción de Passerini de 3 componentes (P-3CR) para generar un intermediario cuya

posterior hidrogenación produce el derivado buscado. El componente carbonílico empleado en la P-3CR es formaldehído, cuya alta reactividad evita que el grupo ceto del ALA interfiera en la reacción, y al mismo tiempo forma el enlace éster requerido.



Esquema 1. Reacciones de Passerini con posterior desprotección para la síntesis de derivados de ALA

Mediante esta secuencia se pudo preparar una familia de derivados con distintos sustituyentes R1, que fueron evaluados *in vitro* para estudiar su actividad como prodrugs de ALA. En la Tabla 1 figuran los compuestos obtenidos. Todos promovieron la biosíntesis de protoporfirina. Entre ellos se destaca el compuesto 2-((4-fluorofenil) amino)-2-oxoetil-5-aminolevulinato (1P). Los compuestos se caracterizaron por ¹H-RMN y ¹³C-RMN, y EM de alta resolución.

Tabla 1: Compuestos dALA sintetizados.

Compuesto	Log D	Estructura
p-fluorofenil-ALA (1P)	-0,36	
Ciclohexil-ALA (2P)	-0,72	
ALA	-3,37	

Nota: Log D es el coeficiente de distribución

Preparación de los nanovehículos

Se evaluó la preparación de dos tipos de nanovehículos: Carriers lipídicos nanoestructurados (NLC) y liposomas ultradeformables (LUDs).

Para la preparación de NLC, se estudió la solubilidad de los compuestos obtenidos en diferentes lípidos, entre ellos, ácido láurico, alcohol cetílico, ácido oleico y oleato de glicerilo. No se logró solubilizar ningún derivado de ALA en los lípidos disponibles. En consecuencia, se propuso la encapsulación de estos derivados de ALA en LUDs.

Los LUDs fueron preparados de acuerdo al método de hidratación de la película delgada empleando fosfatidilcolina de soja y colato de sodio. Se hidrataron con solución 60 mM de cada derivado de ALA en NaCl 0.9% p/v, con agitación magnética. Los liposomas multilamelares resultantes se extruyeron a través de membranas de poro definido de 0,1 µm. Dicha extrusión se realizó con un extrusor manual. De la misma manera se prepararon LUDs sin derivados (LUDs Blanco) como control. Los LUDs cargados se separaron de la droga libre por columna de exclusión molecular con Sephadex® G-50 medium.

Caracterización fisicoquímica de los LUDs

Las suspensiones de LUDs obtenidas se caracterizaron mediante la distribución de tamaño de partícula (Z-Ave) y el índice de polidispersidad (Pdl) por dispersión dinámica de luz. El potencial Z se determinó por análisis en fase de *scattering* de luz (PALS, del inglés *phase analysis light scattering*). Para la determinación de la concentración de LUDs en los eluatos de la columna se realizó la cuantificación de fosfatos mediante la reacción colorimétrica de Böttcher. La eficiencia de encapsulación (%EEp/p) se determinó en las fracciones eluidas que contenían fosfolípidos por cuantificación del ALA y los derivados del ALA mediante la reacción colorimétrica de Ehrlich.

Evaluación *in vitro* de los LUDs

La producción de porfirinas se evaluó empleando como modelo la línea celular de adenocarcinoma mamario murino (LM2). Se incubaron las células con los distintos compuestos, y al cabo de 3 h se realizó la extracción y cuantificación de porfirinas por extracción en HCl 5%. Luego se cuantificó fluorométricamente (excitación: 406 nm; emisión: 604 nm). Se utilizó PpIX (Porphyrin Products, Logan, Utah, USA) como estándar de referencia.

Resultados

Como puede observarse en la Tabla 2, la distribución de tamaño de partícula de los LUDs obtenidos fue la esperada, con un diámetro medio (Z-Ave) menor a 120 nm en todos los casos y un índice de polidispersidad (PDI) menor a 0,2. Mientras que el potencial Z cercano a 0 mV se correlaciona con una baja estabilidad física de los LUDs en suspensión. El compuesto 1 P presenta la mayor eficiencia de encapsulación (%EE) que se correlaciona con su mayor lipofilicidad (mayor log D) permitiendo su mayor retención en la bicapa lipídica (Tabla 2).

Tabla 2: Caracterización fisicoquímica de los LUDs

LUDs	[Fosfato] mM	%EE p/p	Z-Ave nm	Pdl	Pot ZmV
LUDs blanco	45,8	-	114 (1)	0,152 (0,014)	-24 (6)
LUDs ALA	2,4	4,5	91 (2)	0,118 (0,003)	-4 (5)
LUDs 1P	8,6	6,9	120 (2)	0,084 (0,013)	-3 (5)
LUDs 2P	6,8	2,7	106 (2)	0,149 (0,008)	-4 (6)

Nota: Los resultados indicados entre paréntesis corresponden al desvío estándar de la medición.

En la tabla 3, se observan los resultados de producción de porfirinas obtenidos en la evaluación *in vitro* tanto de ALA como de los dALA. La viabilidad por MTT fue de 100% para 1P-ALA LUDs, 2P-ALA LUDs y ALA-LUDs a la concentración más alta (0.6 mM). La producción de porfirinas fue mayor en los estudios con ALA y sus dALA libres que en los LUDs. Esto podría deberse a una inducción en la liberación de las porfirinas al medio extra celular producto del alto contenido lipídico en el citoplasma o por una liberación deficiente del contenido de los LUDs.

Tabla 3: Evaluación *in vitro* de los LUDs

[mM] ALA dALA	ALA libre	2P libre	1P libre	LUDs ALA	LUDs 2P	LUDs 1P
0	20	20	20	19	20	21
0,1	53	83	61	49	49	53
0,3	78	72	76	48	55	47
0,6	77	73	73	45	48	49

Conclusiones

En este trabajo se lograron sintetizar dos derivados de ALA mediante una reacción de Passerini seguida de hidrogenación. Estos derivados fueron obtenidos mediante el desarrollo de una nueva ruta de síntesis partiendo de ácido levulínico. Los derivados obtenidos se pudieron encapsular en LUDs.

Dado que en la línea celular estudiada con LUDs hubo menor producción de porfirinas se evaluará en otras líneas celulares. Además, se emplearán modelos *in vivo* para estudiar la permeación transdérmica.

En futuros abordajes experimentales se probarán nuevos derivados de ALA con mayor liposolubilidad para ser vehiculizados en NLC con el objeto de desarrollar formulaciones de aplicación tópica.

Bibliografía

- M. Kaliszewski et al. Biological activity of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester alter storage under different conditions, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 87 (2007) 67-72.
- Q. Peng, T. Warloe, J. Moan, H. Heyerdahl, H. B. Steen, J. M. Nesland and K.-E. Giercksky, *Photochem. Photobiol.*, 2008, 62, 906–913.
- G. Di Venosa et al. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96 (2009) 152–158.