

*VECTORIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS PARA O CANCRO
HUMANO DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO*

João Nuno Sereno de Almeida Moreira

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra para prestação de Provas de
Doutoramento em Farmácia.



**Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra**

2001

Este trabalho foi parcialmente realizado na qualidade de bolsheiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia, no âmbito do programa PRAXIS XXI (referência: PRAXIS XXI/BD/5600/95).

A capa é uma imagem de microscopia confocal que representa a ligação e a internalização de lipossomas (marcados fluorescentemente e vectorizados pelo antagonista G) pela linha celular clássica de cancro humano de pequenas células do pulmão, H69 (consultar o capítulo 2 desta dissertação e, em particular, a legenda da Figura 2.4., para mais pormenores).

À Isabel, ao Gonçalo, à Sofia, ao meus Pais e restante Família, e aos meus Amigos pelo apoio incondicional sempre demonstrado e que foi decisivo para a concretização deste projecto.

ÍNDICE

Agradecimentos/ <i>Acknowledgments</i>	i
Resumo da tese	iii
<i>Thesis abstract</i>	vii
Abreviaturas.....	xi
CAPÍTULO 1 - Introdução geral	1
Resumo	2
1.1. Cancro humano de pequenas células do pulmão	3
1.2. Líposomas como vectores de fármacos	5
1.2.1. Conceito de vectorização de fármacos.....	5
1.2.2. Vantagens dos líposomas enquanto vectores de fármacos.....	6
1.2.3. Componentes dos líposomas:	
aspectos físico-químicos.....	8
1.2.3.1. Constituição química.....	8
1.2.3.2. Estrutura dos líposomas.....	11
1.2.3.3. Estado físico da bicamada fosfolipídica	15
1.2.4. Métodos de preparação de líposomas	16
1.2.5. Encapsulação de fármacos em líposomas.....	18
1.3. Líposomas em terapia antitumoral	21
1.3.1. Líposomas clássicos ou convencionais	21
1.3.2. Líposomas estabilizados estereamente	26
1.3.2.1. Líposomas estabilizados estereamente com	
monosialogangliósido	26
1.3.2.2. Líposomas estabilizados estereamente com	
poli(etilenoglicol)	29
1.3.3. Líposomas de doxorrubicina estabilizados estereamente com	
poli(etilenoglicol)	34
1.4. Vectorização de líposomas mediada por ligandos.....	38
1.4.1. Considerações gerais.....	38
1.4.2. Métodos de acoplamento de ligandos a líposomas	39
1.4.3. Interação entre líposomas vectorizados e células tumorais	42
1.4.3.1. Ligação de líposomas a receptores celulares.....	42
1.4.3.2. Internalização celular de líposomas mediada por	
receptores.....	44

1.4.3.3. Fusão de lipossomas com a membrana plasmática.....	46
1.4.4. Vectorização <i>in vivo</i> de lipossomas	47
1.4.4.1. Vectorização para tumores no compartimento vascular.....	47
1.4.4.2. Vectorização para tumores na cavidade peritoneal	48
1.4.4.3. Vectorização para tumores sólidos.....	49
1.4.4.3.1. Tumores pulmonares.....	49
1.4.4.3.2. Metástases pulmonares	51
1.4.4.3.3. Tumores implantados subcutaneamente	52
1.5. Objectivo e breve descrição do trabalho.....	53

CAPÍTULO 2 - Utilização de um antagonista de factores de crescimento como agente de vectorização de lipossomas estabilizados estereamente para o cancro humano de pequenas células do pulmão.....

Resumo.....	58
2.1. Introdução	59
2.2. Material e métodos.....	63
2.2.1. Reagentes.....	63
2.2.2. Linhas celulares.....	64
2.2.3. Preparação de lipossomas	65
2.2.4. Acoplamento de antagonista G a lipossomas.....	67
2.2.5. Determinação quantitativa de fosfolípido	69
2.2.6. Associação celular de lipossomas	70
2.2.7. Cinética de associação celular de doxorubicina	72
2.2.8. Citotoxicidade.....	73
2.2.9. Farmacocinética e biodistribuição de lipossomas.....	74
2.2.10. Análise estatística	76
2.3. Resultados	76
2.3.1. Associação celular de lipossomas	76
2.3.2. Cinética de associação celular de doxorubicina	82
2.3.3. Citotoxicidade.....	84
2.3.4. Farmacocinética e biodistribuição de lipossomas.....	87
2.4. Discussão	90

CAPÍTULO 3 - Vectorização e citotoxicidade de doxorubicina lipossômica contra forma variante de cancro humano de pequenas células do pulmão	97
Resumo	98
3.1. Introdução.....	99
3.2. Material e métodos	100
3.2.1. Reagentes.....	100
3.2.2. Células em cultura.....	100
3.2.3. Preparação de lipossomas	100
3.2.4. Associação celular de lipossomas.....	101
3.2.5. Cinética de associação celular de doxorubicina	101
3.2.6. Citotoxicidade.....	102
3.2.7. Libertação <i>in vitro</i> de doxorubicina a partir de lipossomas	102
3.2.8. Análise estatística	103
3.3. Resultados	104
3.3.1. Associação celular de lipossomas.....	104
3.3.2. Cinética de associação celular de doxorubicina	108
3.3.3. Citotoxicidade.....	109
3.3.4. Libertação <i>in vitro</i> de doxorubicina a partir de lipossomas	110
3.4. Discussão	112
CAPÍTULO 4 - Inserção de conjugados de antagonista G-PEG-DSPE em lipossomas pré-formados	115
Resumo	116
4.1. Introdução.....	117
4.2. Material e métodos	120
4.2.1. Reagentes.....	120
4.2.2. Células em cultura.....	120
4.2.3. Preparação de lipossomas	120
4.2.4. Preparação de lipossomas vectorizados pelo método de acoplamento convencional ou pelo método de pós-inserção.....	121
4.2.5. Associação celular de lipossomas.....	123
4.2.6. Libertação <i>in vitro</i> de doxorubicina a partir de lipossomas	123
4.2.7. Citotoxicidade.....	124
4.2.8. Análise estatística	124
4.3. Resultados e discussão	124

CAPÍTULO 5 - Vectorização <i>in vivo</i> de lipossomas estabilizados estereamente para o cancro humano de pequenas células do pulmão.....	131
Resumo.....	132
5.1. Introdução	133
5.2. Material e métodos.....	134
5.2.1. Reagentes.....	134
5.2.2. Linha celular	134
5.2.3. Preparação de lipossomas	134
5.2.4. Desenvolvimento de tumores subcutâneos	135
5.2.5. Desenvolvimento de modelo intravenoso de cancro humano de pequenas células do pulmão em ratinhos com a imunodeficiência severa combinada (SCID)	136
5.2.6. Biodistribuição de lipossomas em ratinhos com tumores subcutâneos	137
5.2.7. Associação celular.....	137
5.2.8. Estudos terapêuticos	138
5.2.9. Análise estatística.....	139
5.3. Resultados	139
5.3.1. Biodistribuição de lipossomas em ratinhos com tumores subcutâneos	139
5.3.2. Associação celular de lipossomas	141
5.3.3. Estudos terapêuticos	143
5.4. Discussão	146
CAPÍTULO 6 - Considerações finais e perspectivas futuras.....	153
Referências bibliográficas.....	167

AGRADECIMENTOS/ACKNOWLEDGMENTS

Ao Professor Doutor Rogério Gaspar quero expressar o meu profundo reconhecimento pela sua orientação científica e revisão crítica desta dissertação. Desejo também manifestar o meu agradecimento pela sua amizade e confiança em mim sempre depositada, bem como pela sua perseverança e determinação que permitiram criar as condições indispensáveis para a realização deste trabalho.

To Dr. T. M. Allen from the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Alberta, Edmonton, Canada, I am extremely grateful for having accepted me in her laboratory and also for her knowledgeable advice and guidance throughout the work and in preparing manuscripts.

A título póstumo, ao Professor Doutor António Pinho de Brojo, Director do Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia de Coimbra à data de início deste projecto, quero expressar o meu apreço pelo apoio e incentivo sempre demonstrados, do ponto vista académico e científico.

Ao Professor Doutor Adriano Teixeira Barbosa de Sousa, actual Director do Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia de Coimbra, o meu agradecimento pelo apoio e pelas facilidades sempre concedidas para o prosseguimento da minha actividade académica e científica.

To the group of people who worked in Dr. Allen's laboratory (known as the "Lipozoids"), who have strongly contributed with their knowledge and friendship. The "Lipozoids" are: Christian Hansen, Elaine Moase, Susan Cubitt, Daniel Menezes, Darrin Stuart, Greg Charrois, George Wardle, Cheryl Santos, Felicity Wang, Jihan Marjan, Jennifer Szydlowski, René LeClerc, Fabio Pastorino, Marc Kirchmeier, Tatsuhiro Ishida, Zsolt Gabos, Jeff Gagné, Janny Zhang and Puja Sapra.

To Dr. Nick Nation from the University of Alberta, I would like to thank the help with gross histopathological examination of mice. I would also like to thank Dr. Xuejun

Sun from the Department of Oncology, Cross Cancer Institute, for suggestions on confocal experiments.

Às Professoras Doutoradas Conceição Pedroso de Lima e Catarina Resende de Oliveira do Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, desejo expressar o meu profundo agradecimento pela forma como sempre me disponibilizaram as suas instalações e equipamento.

Às Dras. Lucília Silveira e Ana Donato do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia de Coimbra, agradeço as facilidades concedidas na utilização do leitor ELISA.

Aos Amigos e colegas Professor Doutor Sérgio Simões e Mestre Luís Almeida, o meu agradecimento pelo privilégio da sua inigualável amizade, pelas discussões altamente proveitosas e pelas contínuas palavras de incentivo. Ao Professor Doutor Sérgio Simões quero, em particular, agradecer a leitura crítica desta dissertação.

Às Professoras Doutoradas Maria de Lourdes Costa e Maria de Lourdes Rebelo e ao Professor Doutor João Rui Pita do Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia de Coimbra, agradeço o apoio e amizade sempre demonstrados.

Ao pessoal técnico e auxiliar do Laboratório de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia de Coimbra, de que destaco a Dra. Teresa Alvim, as Sr^{as} D. Maria Joaquina Cristovão, Luísa Bronze e Rosária Silva e o Sr. José Cruz, o meu reconhecimento pelo apoio e amizade sempre manifestados.

A todos aqueles, que directa ou indirectamente, tornaram possível a concretização deste trabalho o meu sincero agradecimento.

RESUMO DA TESE

O cancro humano de pequenas células do pulmão é um tumor com uma elevada capacidade de metastização e representa 25% do total de tumores pulmonares. Dentro do cancro humano de pequenas células do pulmão é possível distinguir dois subtipos (ou formas): o clássico e o variante. Apesar da proeminência da forma dita clássica (que representa cerca de 70% do total de cancro humano de pequenas células do pulmão), esta é susceptível de evoluir para o subtipo variante. Esta transformação é associada a possíveis alterações da expressão de proteínas membranares (receptores), a um aumento da proliferação celular, a uma amplificação da expressão do proto-oncogene *c-myc* e a uma maior resistência à quimioterapia. Nestes pacientes, apesar de ser observável uma resposta inicial a quimioterapia e a radioterapia, a doença progride rapidamente, sendo a percentagem de doentes que sobrevive durante 5 anos inferior a 5%. É assim evidente a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Este tipo de células tumorais têm a capacidade de secretar para o meio extracelular vários tipos de neuropeptídeos (também designados por factores de crescimento), os quais são susceptíveis de se ligarem a receptores existentes à superfície dessas mesmas células. Desta interacção resulta um conjunto de sinais intracelulares que culmina com síntese de DNA e proliferação celular. Com base neste conhecimento desenvolveram-se substâncias, designadas por antagonistas, que bloqueiam os efeitos mitogénicos desencadeados pelos factores de crescimento. Dentro destes, destaque-se o hexapeptídeo H-Arg-D-Trp-N^{me}Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂, designado por antagonista G, que bloqueia particularmente a acção da vasopressina e da bradiquinina.

O presente trabalho teve por objectivo testar a capacidade do antagonista G como agente de vectorização de lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol) (PEG), também designados por lipossomas Stealth[®], tanto *in vitro* como *in vivo*.

Foi demonstrado que o acoplamento covalente do antagonista G (1 µg de peptídeo/µmol de fosfolípido) na extremidade das cadeias de PEG existentes à superfície de lipossomas (SLG), através de uma ligação tioéter, é susceptível de vectorizar os lipossomas

para células clássicas (H69) e variantes (H82) de cancro humano de pequenas células do pulmão. Os SLG ligam-se com maior avidéz às células tumorais do que o peptídeo livre, de que resulta a internalização celular dos lipossomas vectorizados (num máximo de 12000-13000 SLG/célula), através de um processo mediado por receptores e que envolve a formação intracelular de vesículas revestidas com clatrina. Adicionalmente, foi demonstrado que a cedência nuclear de doxorrubicina (DXR) é significativamente melhorada quando se efectua por intermédio dos SLG, traduzindo-se num aumento da actividade citotóxica relativamente à actividade do mesmo fármaco encapsulado em lipossomas sem antagonista G (DXR-SL).

Estudos de biodistribuição realizados em ratinhos são revelaram que os SLG (marcados radioactivamente com [¹²⁵I]tiraminilulina) acumulam-se preferencialmente no baço e no fígado. Em termos farmacocinéticos estes lipossomas evidenciaram um tempo de semi-vida sanguíneo de 13 h.

A aplicação clínica das formulações lipossómicas vectorizadas por ligandos depende, em parte, do desenvolvimento de metodologias de preparação mais simples e que permitam a sua produção em larga escala. Neste trabalho foi também testada a aplicabilidade de uma tecnologia recentemente desenvolvida (designada por tecnologia de pós-inserção), na inserção de conjugados de antagonista G-PEG-distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) em lipossomas pré-formados e com PEG. O hexapeptídeo antagonista G foi primeiramente acoplado covalentemente, através de uma ligação tioéter, à extremidade das cadeias de PEG-DSPE e organizadas sob a forma de micelas. Seguidamente, procedeu-se à transferência, num único passo, dos conjugados de antagonista G-PEG-DSPE da fase micelar para os lipossomas pré-formados. Esta tecnologia de preparação de lipossomas vectorizados conduziu à obtenção de lipossomas com cerca de 0,3 µg de antagonista G/µmol de fosfolípido. Os lipossomas assim obtidos apresentaram um aumento significativo da associação celular relativamente aos lipossomas não vectorizados e, quando contendo DXR, apresentaram níveis de citotoxicidade semelhantes aos apresentados pelos SLG. A técnica de pós-inserção revelou-se uma forma simples de preparar lipossomas vectorizados por

peptídeos biologicamente activos, como o antagonista G.

Foi também avaliada a acumulação tumoral e a actividade terapêutica de lipossomas com PEG (vectorizados ou não pelo antagonista G) e contendo, respectivamente, [¹²⁵I]tiraminilulina e DXR. O modelo animal utilizado neste estudo foram ratinhos atímicos *Balb/c nude* com tumores subcutâneos resultantes da inoculação de células clássicas de cancro humano de pequenas células do pulmão (H69). Nos estudos de biodistribuição, e decorridas 48 e 72 h após administração, a acumulação tumoral dos lipossomas revelou ser independente da presença do antagonista G. Os níveis máximos de acumulação tumoral, tanto para os SL como para os SLG, variaram entre 2 e 4 % da dose injectada/g de tecido. Nos estudos terapêuticos, os animais, com volumes tumorais iniciais de 7 ou 33 mm³, foram tratados semanalmente (e durante 3 semanas) com 3 ou 6 mg de DXR livre/kg de peso corporal ou com 3 ou 10 mg de DXR lipossómica/kg de peso corporal. A eficácia terapêutica da DXR-SL ou da DXR-SLG, para as doses mais elevadas, foi significativamente superior à da DXR livre, não se tendo, no entanto, registado quaisquer diferenças entre a DXR-SL e a DXR-SLG. Destes resultados, destaca-se, todavia, o potencial terapêutico dos lipossomas Stealth[®] (não vectorizados) contendo DXR contra o cancro humano de pequenas células do pulmão.

No trabalho apresentado nesta dissertação ficou provado que é possível utilizar peptídeos como o antagonista G para promover a ligação e a internalização de lipossomas estabilizados estereamente (e do correspondente material encapsulado) pelas células de cancro humano de pequenas células do pulmão. Espera-se que esta descoberta, a par do desenvolvimento de novas moléculas com actividade farmacológica, possa contribuir para a concepção de formas de tratamento mais eficazes contra o cancro humano de pequenas células do pulmão.

THESIS ABSTRACT

Human small cell lung cancer is a highly metastatic tumor that accounts for 25% of all pulmonary cancers and is divided in two different sub-types: classic and variant. Classic small cell lung cancer represents 70% of all small cell lung cancer and is believed to undergo a progression to a variant form. This transformation is associated with possible changes in surface proteins (receptors), increased cell proliferation, amplification of the c-myc proto-oncogene and increased resistance to chemotherapy. Despite an initial responsiveness to radiotherapy and chemotherapy, small cell lung cancer progresses rapidly with a 5-year survival rate of less than 5%. Hence, new therapies are urgently needed. Small cell lung cancer is known to secrete multiple neuropeptides, whose binding to specific cell receptors triggers a cascade of intracellular signals culminating in DNA synthesis and cell proliferation. This has led to the development of antagonists that block the mitogenic effects of neuropeptide growth factors. Among these, the hexapeptide, H-Arg-D-Trp-N^{me}Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂, known as antagonist G, has gained special relevance. Antagonist G is a broad spectrum antagonist, that competitively blocks the action of multiple neuropeptides (e.g., vasopressin and bradykinin) through its ability to bind to several receptors on the surface of small cell lung cancer cells.

In this work we investigated the ability of antagonist G to target polyethylene glycol (PEG)-grafted liposomes (known as sterically stabilized or Stealth[®] liposomes), both in vitro and in vivo.

It was shown that the covalent attachment of antagonist G (1 µg of peptide/µmol of phospholipid) to PEG-grafted liposomes (SLG), through a thioether bond, targeted liposomes to both classic (H69) and variant (H82) human small cell lung cancer cells. SLG bound to tumor cells with higher avidity than free antagonist G and were internalized (reaching a maximum of 12000-13000 SLG/cell), mainly through a receptor-mediated process, involving clathrin-coated pits. Moreover, it was shown that SLG significantly improved the nuclear delivery of encapsulated doxorubicin (DXR) to the target cells, thus

increasing the cytotoxic activity of the drug over non-targeted liposomes (SL).

Biodistribution studies performed in healthy mice showed that [¹²⁵I]tyraminylinulin-containing SLG accumulated mainly in the spleen and liver. In addition, targeted liposomes demonstrated to be long circulating, with a half-life of 13 h.

Simple methods for the large-scale manufacture of ligand-targeted liposomes will be needed if they are to proceed to clinical trials. In this work, it was also tested a recently developed technology for inserting peptide ligands into pre-formed Stealth[®] liposomes (post-insertion technology). The hexapeptide antagonist G was covalently coupled via a thioether bond to the terminus of PEG-distearoylphosphatidylethanolamine in micelles, followed by transfer into preformed liposomes during a one step incubation. The post-insertion approach to the formation of peptide-targeted liposomes led to the production of liposomes bearing a maximum of approximately 0,3 µg antagonist G/µmol phospholipid. These liposomes presented increased cellular association to H69 cells relative to non-targeted liposomes and, when loaded with DXR, similar levels of cytotoxicity to those obtained by conventional coupling techniques. The post-insertion technique proved to be a simple and effective means for the production of biologically active peptide-targeted liposomes.

Tumor accumulation and therapeutic activity of Stealth[®] liposomes, targeted and non-targeted, were examined in athymic Balb/c nude mice inoculated subcutaneously with the human small cell lung cancer cell line, H69. At 48 and 72 h post-injection, tumor accumulation of [¹²⁵I]-tyraminylinulin-containing liposomes was shown to be independent of the presence of the targeting ligand. Maximum tumor uptake of either SLG or SL ranged from 2-4 % of injected dose/g of tissue. In therapeutic studies, mice received 3 weekly injections of 3 or 6 mg free DXR/kg or 3 or 10 mg liposomal DXR/kg at initial tumor volumes of either 7 or 33 mm³. The therapeutic efficacy of DXR-containing SL or SLG was significantly improved over that of free DXR, but SLG did not improve antitumor efficacy relative to SL. Non-targeted Stealth[®] liposomes containing DXR have potential as a therapy against human small cell lung cancer.

Overall, it was demonstrated that it is possible to use peptides like antagonist G to

promote binding and internalization of sterically stabilized liposomes, and thus intracellular delivery of their accompanying drug loads, into small cell lung cancer cells. This finding, along with the development of new drugs, will hopefully contribute to the conception of new therapeutic strategies against small cell lung cancer.

ABREVIATURAS

AUC	Área abaixo da curva da concentração sanguínea em função do tempo
CHOL	Colesterol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DTT	Ditiotreitol
DXR	Doxorrubicina
DXR-SL	Lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol) contendo doxorrubicina
DXR-SLG	Lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol) contendo doxorrubicina e vectorizados pelo antagonista G
DXR-SLP(1-9)	Lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol) contendo doxorrubicina e vectorizados pelo peptídeo não específico, substância P(1-9)
EMCS	Éster hidroxisuccinimida do ácido ϵ -maleiamidocapróico
FBS	Soro fetal de bovino
FL	Fosfolípido
HEPES	Ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etanossulfônico
HOOC-PEG-DSPE	Distearoil-N-(3-carboxipropionoil poli(etilenoglicol) succinil) fosfatidiletanolamina
HPTS	8-hidroxi-1,3,6-trissulfonato de pireno
HSPC	Fosfatidilcolina hidrogenada de soja
HZ-PEG-DSPE	Hidrazida-poli(etilenoglicol)-distearoilfosfatidiletanolamina
iodo-GEN	1,3,4,6-tetracloro-3 α ,6 α -difenilglicouril
K ₁₀	Constante da velocidade de eliminação do compartimento vascular
MAL-PEG-DSPE	Maleiamido-poli(etilenoglicol)-distearoilfosfatidiletanolamina
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
MRT	Tempo médio de residência
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio
ND	Não determinado
PBS	Tampão fosfato salino a pH 7,4 (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na ₂ HPO ₄ 8,10 mM, KH ₂ PO ₄ 1,47 mM)
PDP-PEG-DSPE	N-(3'-(piridilditio)propionoil)amino-poli(etilenoglicol)2000-distearoilfosfatidiletanolamina

PEG	Poli(etilenoglicol)
PEG-DSPE	Metoxi poli(etilenoglicol)2000-N-1,2-distearoilfosfatidiletanolamina
PLG	Lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol) vectorizados pelo antagonista G e preparados pela técnica de pós-inserção
RPMI 1640	Meio de cultura de células <i>Roswell Memorial Park Institute</i> 1640
SCID	Imunodeficiência severa combinada
SL	Lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol)
SLG	Lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol) e vectorizados pelo antagonista G
SLG _{MAL}	Lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol), vectorizados pelo antagonista G e preparados pelo método de acoplamento que envolve a utilização do lípido MAL-PEG-DSPE
SLG _{PDP}	Lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol), vectorizados pelo antagonista G e preparados pelo método de acoplamento que envolve a utilização do lípido PDP-PEG-DSPE
SLP(1-9)	Lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol) e vectorizados pelo peptídeo não específico, substância P(1-9)
Solução tampão TEA	Solução tampão constituída por trietanolamina 10 mM, sacarose 250 mM, ácido acético 10 mM e ácido etilenodiaminotetraacético 1 mM, a pH 7,4
T _{1/2} α	Tempo de semi-vida na fase de eliminação inicial (α)
T _{1/2} β	Tempo de semi-vida na fase de eliminação terminal (β)
[¹²⁵ I]TI	Tiraminilulina marcada radioactivamente com o radioisótopo ¹²⁵ I
[³ H]CHE	Éter [1 α ,2 α (n)- ³ H] colesteril hexadecilo



*Tese de Doutoramento
Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra
2001*

CAPÍTULO 1

Introdução geral

RESUMO

O cancro humano de pequenas células do pulmão é, de entre todos os tumores sólidos, aquele com maior potencial de metastização sistémica e linfática e representa cerca de 25% do total das várias formas de cancro humano do pulmão. Nos doentes com este tipo de cancro a doença progride rapidamente e, apesar de poderem responder positivamente quando submetidos a quimioterapia e a radioterapia, a percentagem que sobrevive 5 anos é inferior a 5%. Sendo a quimioterapia um dos tratamentos de eleição para este tipo de tumores, torna-se premente o desenvolvimento de novas estratégias que permitam melhorar a eficácia terapêutica de citostáticos. Neste contexto, os lipossomas podem assumir um papel de relevo. A encapsulação de um fármaco em lipossomas determina uma profunda modificação das propriedades farmacocinéticas e de biodistribuição do primeiro, que passam a ser função das características físico-químicas dos lipossomas, com a concomitante alteração do padrão de toxicidade original e da eficácia terapêutica. Neste capítulo, são revistas as principais características relativas ao uso dos lipossomas como vectores de fármacos. Em adição, são abordados os aspectos mais relevantes relacionados com a utilização em terapia antitumoral dos lipossomas ditos clássicos ou convencionais (lipossomas que não possuem compostos hidrofílicos à sua superfície), dos lipossomas estabilizados estereamente com compostos hidrofílicos como o monosialogangliósido ou o poli(etilenoglicol) e dos lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol) vectorizados por intermédio de ligandos acoplados covalentemente na extremidade daquele polímero hidrofílico.

1.1. CANCRO HUMANO DE PEQUENAS CÉLULAS DO PULMÃO

O cancro do pulmão com origem no epitélio do aparelho respiratório constitui a principal causa de morte de origem cancerígena nos países desenvolvidos (Sekido *et al.*, 1998). Nos países da União Europeia surgem anualmente cerca de 150000 novos casos, tendendo este número a aumentar. Em Portugal estima-se que seja a primeira causa de morte oncológica em indivíduos do sexo masculino e a quinta no sexo feminino (Sotto-Mayor e Queiroga, 1997).

Histologicamente, o cancro do pulmão pode ser dividido em quatro subtipos: epidermóide, adenocarcinoma, cancro de grandes células e cancro de pequenas células. O cancro de pequenas células representa 20 a 25% dos novos casos de cancro do pulmão (Carney, 1988). Tem origem na mucosa brônquica dos grandes brônquios (Sotto-Mayor e Queiroga, 1997) e é despoletado, essencialmente, pelos carcinogéneos provenientes do fumo do tabaco (Cook *et al.*, 1993). Estes interferem com a replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA), devido à actuação ao nível de enzimas específicas ou por ligação covalente ao DNA, de que resulta o aparecimento de mutações (Sekido *et al.*, 1998). A acção nociva destes carcinogéneos pode exercer-se, para além do fumador, também em pessoas que não sejam fumadoras, mas que vivam em ambientes com muito fumo. No caso particular de crianças e adolescentes, a exposição ao fumo aumenta de forma acentuada o risco de ocorrência futura de cancro de pequenas células do pulmão. Etiologicamente, há a acrescentar factores ambientais, como a exposição a amianto, a radiação ionizante ou a éteres clorometílicos (e que têm uma acção sinérgica com o fumo do tabaco), dietas deficientes em vitamina A, bem como, uma possível predisposição genética (Cook *et al.*, 1993).

O cancro de pequenas células do pulmão, de entre todos os tumores sólidos, é aquele com maior potencial de metastização (sistémica e linfática) em humanos (Moore *et al.*, 1998). Após formação de um tumor primário, ocorre uma rápida metastização local para nódulos linfáticos mediastínicos e hilares e que, numa fase mais avançada, se pode estender ao cérebro, fígado, medula espinal, ossos, glândulas adrenais e pâncreas. De entre as desordens fisiológicas mais comuns nestes doentes destaca-se o desenvolvimento de

hiponatremia, o síndrome de Cushing (que inclui edema, fraqueza e intolerância a carboidratos), o síndrome carcinóide (eritemas, diarreia e problemas respiratórios e cardíacos) e problemas neurológicos (degeneração do cerebelo, encefalomielite, degeneração da retina e neuropatias periféricas). À data do diagnóstico (feito, por exemplo, através de radiografia do tórax ou de citologia da expectoração), a sintomatologia observada (em que a tosse, perda de peso e dispneia têm a maior incidência) decorre geralmente da existência de metástases extra-torácicas (Cook *et al.*, 1993). A partir desta altura e na ausência de qualquer tratamento, o tempo médio de sobrevivência destes doentes situa-se entre 6 a 12 semanas (Comis *et al.*, 1998).

Ao contrário dos outros subtipos de cancro do pulmão anteriormente referidos, em que a esperança de cura assenta num diagnóstico precoce e na remoção cirúrgica do tumor, no caso do cancro de pequenas células do pulmão, quando num estágio de disseminação dito limitado (confinado ao hemitórax de origem, ao mediastino e aos nódulos supraclaviculares), a quimioterapia, juntamente com a radioterapia torácica, constituem a principal forma de tratamento. De entre os citostáticos clinicamente mais utilizados destaque-se a doxorrubicina, a cisplatina, o etopósido, a vincristina e a ciclofosfamida, os quais são administrados, geralmente, sob a forma de combinações de dois ou mais fármacos. De salientar que, nesta fase de disseminação limitada do tumor, a cirurgia, seguida de quimioterapia e/ou radioterapia, pode também constituir uma modalidade de tratamento. A sua utilização é restrita, todavia, aos doentes que ainda não apresentem disfunções acentuadas da actividade pulmonar. No caso da doença ser generalizada, a quimioterapia e a radioterapia continuam a ser as principais formas de tratamento. Na sequência da existência de metástases, a aplicação de radioterapia estende-se também a locais como o cérebro, em que a acção paliativa da quimioterapia não é imediata (Johnson e Minna, 1988; Cook *et al.*, 1993; Ihde *et al.*, 1997; Comis *et al.*, 1998). Com estas abordagens terapêuticas, os tempos médios de sobrevivência são de 12 a 16 meses, no caso da doença limitada (em que 20-30% dos doentes sobrevivem mais do que 2 anos), e de 7 a 11 meses, no caso na doença generalizada (em que 2 a 5% dos doentes sobrevivem mais do que 2 anos).

Os dados apresentados são demonstrativos da agressividade do cancro humano de pequenas células do pulmão e da consequente necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Estas devem, por exemplo, evitar (ou minimizar) os efeitos secundários inerentes à utilização de citostáticos e melhorar a sua eficácia terapêutica, promovendo o acesso mais eficaz aos tumores e aos respectivos *alvos* intracelulares. Neste contexto, os vectores de fármacos, e em especial os lipossomas, encerram um enorme potencial, como a seguir se discute.

1.2. LIPOSSOMAS COMO VECTORES DE FÁRMACOS

1.2.1. Conceito de vectorização de fármacos

Em termos farmacocinéticos, a administração extravascular de um fármaco, engloba uma primeira etapa de absorção, que consiste na chegada do fármaco ao sangue, e depois uma fase de distribuição, traduzida pela passagem do fármaco do sangue para diferentes tecidos, que podem corresponder ou não ao seu local de acção. Seguem-se as fases de eliminação (depuração do fármaco quimicamente intacto, frequentemente por via urinária) e/ou metabolização em um ou mais metabolitos. No caso da administração intravenosa, a farmacocinética é simplificada, uma vez que não ocorre a fase de absorção (Monteiro, 1986).

Qualquer dos processos farmacocinéticos depende essencialmente das características físico-químicas do fármaco, como seja, por exemplo, o pKa (Roblot-Treupel e Puisieux, 1986). Em termos práticos, a administração de um fármaco traduz-se pela sua distribuição indiscriminada pelos diversos tecidos, órgãos ou células do organismo e, consequentemente, por uma ausência de especificidade para as áreas que necessitam de tratamento. O resultado pode ser o aparecimento de efeitos secundários de acentuada toxicidade.

A vectorização de fármacos consiste numa associação física ou química de um fármaco com um agente apropriado (designado por vector). Este pode ser de natureza macromolecular, polimérica ou lipídica (revisto por Barbosa, 1995) e é escolhido em função

de um determinado objectivo terapêutico, com o intuito de tornar a distribuição do fármaco no organismo independente das suas propriedades físico-químicas, passando a ser função das propriedades físico-químicas do vector. Em termos práticos pretende-se, por um lado, proteger o fármaco desde o local de administração até ao local de acção e, por outro lado, favorecer a sua acumulação (relativamente ao fármaco na forma livre) num determinado órgão, tecido ou célula (Puisieux e Roblot-Treupel, 1989; Moreira, 1994).

1.2.2. Vantagens dos lipossomas enquanto vectores de fármacos

Os lipossomas são vesículas lipídicas formadas espontaneamente mediante hidratação de um filme lipídico seguida de agitação mecânica, e são constituídas por uma ou mais bicamadas concêntricas (cada uma com uma espessura aproximada de 4 nm) que delimitam um espaço aquoso. Na Figura 1.1. representa-se um lipossoma unilamelar (secção 1.2.3.2.) que resume esquematicamente os vários tipos de lipossomas discutidos neste capítulo: lipossomas clássicos ou convencionais (lipossomas que não possuem compostos hidrofílicos à sua superfície), lipossomas estabilizados estereamente (no caso com poli(etilenoglicol)) e os lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol) e vectorizados por ligandos.

O diâmetro médio¹ dos lipossomas pode variar desde 20 nm até várias dezenas de micrómetros (Lasic, 1993b). Os lipossomas foram descritos pela primeira vez na década de 60 por Bangham *et al.* (1965). Estes autores verificaram que as propriedades de difusão de catiões e aniões univalentes através das membranas das vesículas de lecitina eram muito semelhantes às observadas nas membranas biológicas. Desde então, os lipossomas têm sido utilizados como modelos de estudo das membranas biológicas (Bangham *et al.*, 1974) e, na década de 70, Gregoriadis propôs a sua utilização como vectores de fármacos (Gregoriadis, 1973; Gregoriadis, 1976a; Gregoriadis, 1976b). Actualmente, os lipossomas assumem, como vectores de fármacos, uma posição de relevo face às vantagens decorrentes das características únicas deste sistema, que os tornam veículos seguros e eficazes. Entre essas características salientam-se:

¹ Neste trabalho serão utilizados indistintamente os termos *diâmetro médio* ou *tamanho* de lipossomas.

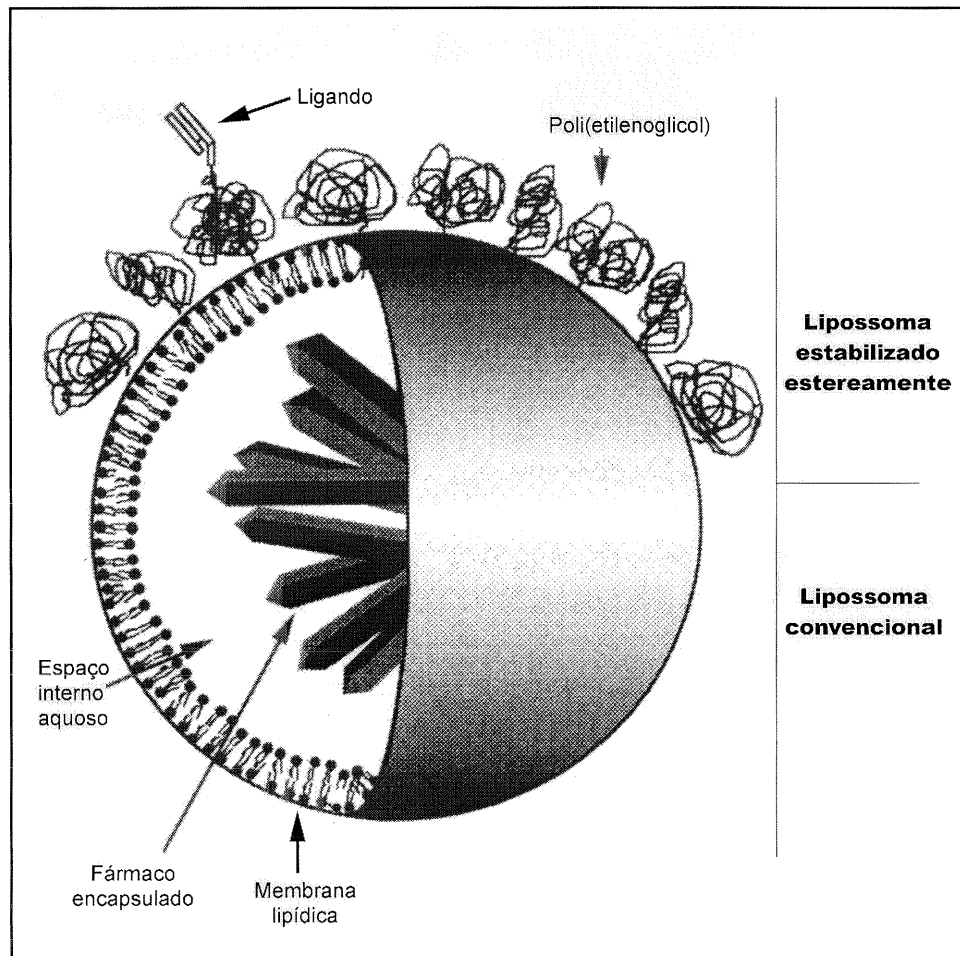


Figura 1.1. - Representação de um lipossoma, estabilizado ou não estereamente com poli(etilenoglicol). Os lipossomas são vesículas formadas por uma membrana lipídica que delimita um espaço interno aquoso, que pode ser usado para encapsular fármacos vários. Alternativamente, o fármaco pode distribuir-se no seio da bicamada lipídica. Em função da presença ou ausência de polímeros hidrofílicos (caso do poli(etilenoglicol)) à sua superfície, assim os lipossomas são designados, respectivamente, por lipossomas estabilizados estereamente ou lipossomas clássicos ou convencionais. Outras modificações que se podem realizar ao nível da superfície dos lipossomas, incluem o acoplamento de um determinado ligando nas extremidades deste polímero, de que pode resultar a endocitose do sistema lipossómico por células tumorais que expressam receptores específicos para aquele ligando. No decurso deste capítulo abordar-se-á cada um destes tipos de lipossomas (adaptado de Drummond *et al.*, 1999).

- a biocompatibilidade, em virtude da sua composição em substâncias com baixa toxicidade intrínseca (Allen, 1997);

- a possibilidade de encapsulação e de transporte de moléculas hidrófilas (Allen *et al.*, 1992), anfifílicas (Bolotin *et al.*, 1994) ou hidrófobas (Koning *et al.*, 1999b), devido à existência de um núcleo interno aquoso e da bicamada fosfolipídica de carácter lipófilo;

- a possibilidade de manipulação das suas características físico-químicas (como por

exemplo, o tamanho e a composição), que proporciona uma grande versatilidade no controlo do seu comportamento *in vitro* e *in vivo*, ao ponto de, por exemplo, a libertação do conteúdo aquoso poder ser função, consoante a composição dos lipossomas, de uma variação de pH (Slepushkin *et al.*, 1997; Zignani *et al.*, 2000; Simões *et al.*, 2001) ou de temperatura (Needham *et al.*, 2000).

As vantagens enumeradas conferem aos lipossomas um grande potencial de aplicação, na sua qualidade de vectores, em áreas tão variadas como a imagiologia (Krause *et al.*, 1995), a formulação de vacinas (Daemen *et al.*, 1998), a terapia génica (Simões *et al.*, 1999), o tratamento de doenças auto-imunes (caso da artrite reumatóide; Corvo, 1998), e, naturalmente, a terapia antitumoral, âmbito em que se insere a presente dissertação. Consoante o tipo de moléculas a veicular, assim a formulação e as propriedades biofarmacêuticas dos lipossomas podem variar de forma substancial. Este capítulo centrar-se-á nos lipossomas utilizados no transporte de fármacos correntemente empregues em quimioterapia convencional.

1.2.3. Componentes dos lipossomas: aspectos físico-químicos

1.2.3.1. Constituição química

Os grupos de moléculas utilizados com maior frequência na preparação de lipossomas e, em particular, daqueles destinados à vectorização de citostáticos, são os glicerofosfolípidos, que em linguagem corrente são genericamente designados por fosfolípidos, e os esteróis (com especial relevo para o colesterol). Ambos os componentes caracterizam-se por possuir propriedades anfifílicas.

Os glicerofosfolípidos são moléculas saponificáveis, ou seja, em meio alcalino, hidrolisam-se e degradam-se nos sabões dos seus ácidos gordos, lisocompostos e álcoois (Lasic, 1993a). Os glicerofosfolípidos são formados por uma molécula de glicerol em que dois dos grupos hidroxilo (normalmente os da posições 1 e 2) são esterificados com ácidos gordos, enquanto que o da posição três está esterificado com o ácido fosfórico, que por sua vez se pode ligar a outros grupos polares, como sejam os grupos colina ou etanolamina (grupos R2 representados na Figura 1.2.). A parte hidrofóbica dos glicerofosfolípidos é constituída por uma ou duas cadeias de ácidos gordos, com um comprimento variável entre 8 e 24 átomos de carbono, sendo o mais frequente entre 14 e 18 átomos de carbono, podendo

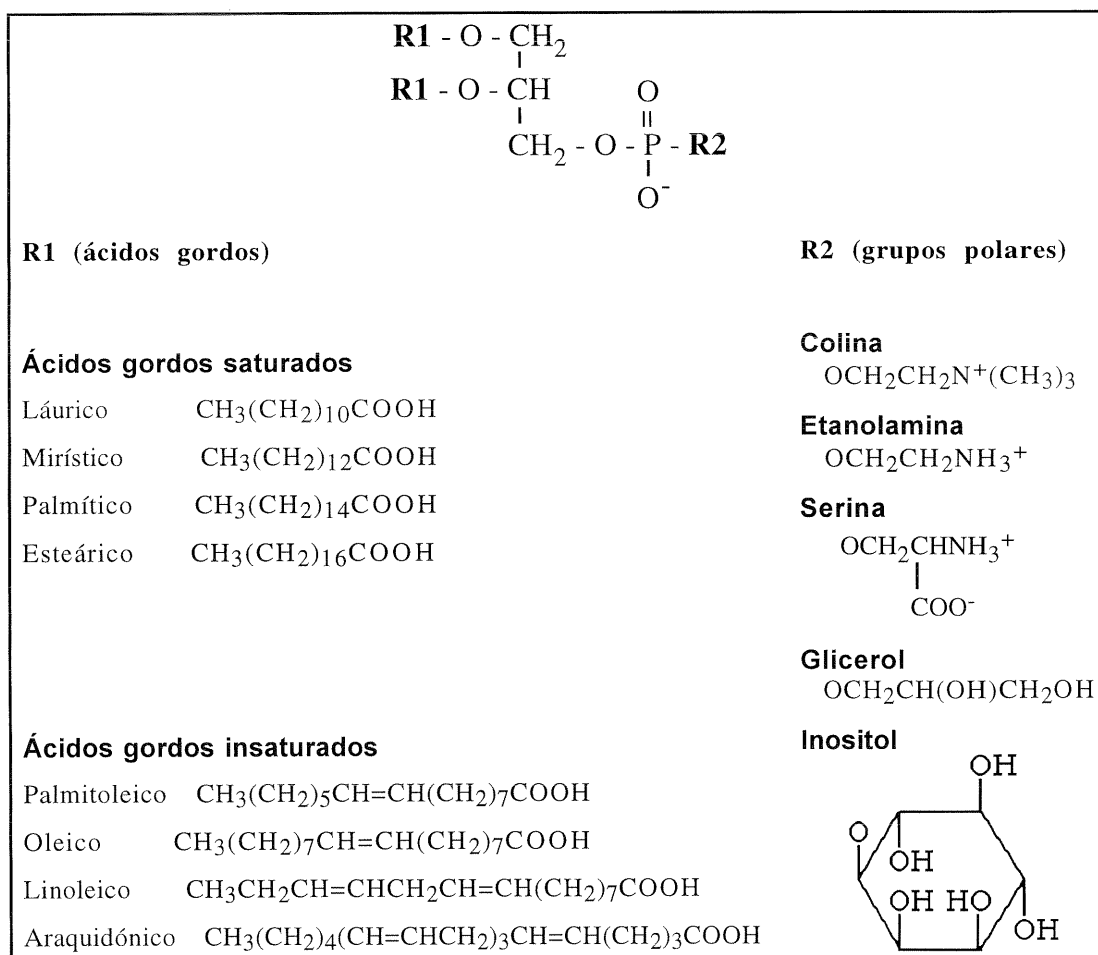


Figura 1.2. - Estrutura química de alguns glicerofosfolípidos utilizados na preparação de lipossomas. A estrutura química de base dos glicerofosfolípidos consiste numa molécula de glicerol em que dois dos grupos hidroxilo do glicerol (normalmente os da posições 1 e 2) são esterificados com ácidos gordos (R1), de cadeia saturada ou insaturada e com um número variável de átomos de carbono, enquanto que o da posição três está esterificado com o ácido fosfórico, que por sua vez se pode ligar a outros grupos polares, R2 (adaptado de Lasic, 1993a).

ser saturadas ou insaturadas, com uma a quatro ligações duplas. Os grupos polares constituintes destes tipo de lípidos podem ser carregados positiva ou negativamente, podem ter características isoeléctricas ou serem ainda desprovidos de qualquer carga (Lasic, 1993a).

Os glicerofosfolípidos podem ser de origem natural (exemplo: gema de ovo ou sementes de soja) ou sintéticos. Relativamente aos primeiros, estes podem ser modificados ou não, através, por exemplo, da hidrogenação parcial ou completa das cadeias acilo dos ácidos gordos de que resultam fosfolípidos parcial ou totalmente saturados e menos sensíveis à oxidação. Os lípidos sintéticos distinguem-se pelo facto de terem uma composição em cadeias hidrocarbonadas bem definida, o que determina que as estruturas que possam vir a constituir tenham também propriedades físicas bem definidas (Lasic, 1993a; Storm e Woodle, 1998). Refira-se, a título de exemplo, a fosfatidilcolina hidrogenada de soja que é o constituinte membranar que existe em maior quantidade nos lipossomas utilizados nesta dissertação.

Os esteróis, ao contrário dos glicerofosfolípidos, são moléculas insaponificáveis que, apesar de não formarem estruturas em bicamada, podem ser incorporados na membrana dos lipossomas. O colesterol é o esteroide mais comum na formulação de lipossomas como vectores de fármacos, contribuindo para o aumento da sua estabilidade *in vitro* e *in vivo* (Gregoriadis e Davis, 1979; Kirby *et al.*, 1980).

Estruturalmente, o colesterol é formado por um núcleo esteróide plano que inclui três anéis com seis átomos de carbono e um anel com cinco átomos de carbono (Figura 1.3.A). Sendo uma molécula anfipática, o colesterol insere-se na bicamada fosfolipídica com o grupo hidroxilo da posição três orientado na direcção da superfície aquosa, e alinhado com os resíduos carboxilos das ligações ésteres dos glicerofosfolípidos (com os quais interage através da formação de ligações por pontes de hidrogénio). A cadeia alifática posiciona-se paralelamente com as cadeias acilo dos ácidos gordos dos glicerofosfolípidos no centro da bicamada (Figura 1.3.B). A presença do núcleo esteróide rígido ao longo, aproximadamente, dos primeiros nove átomos de carbono das cadeias acilo dos ácidos

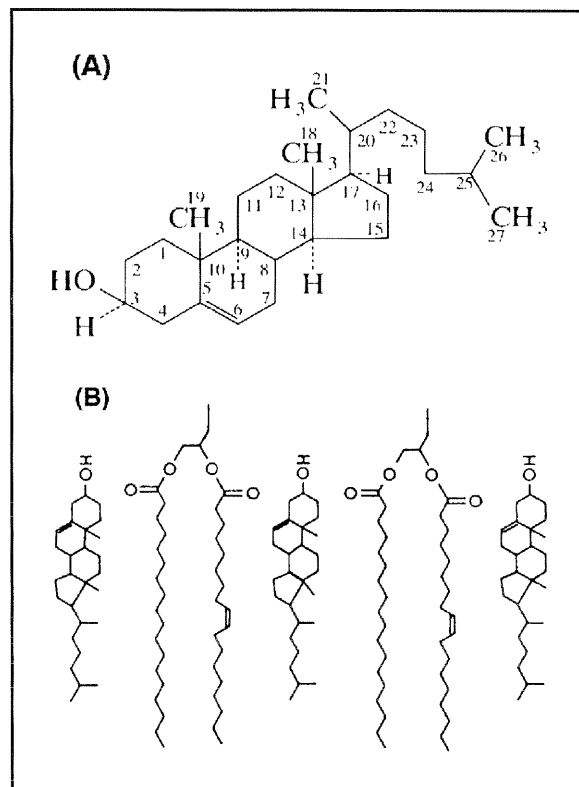


Figura 1.3. - Estrutura química do colesterol (A) e sua posição relativa numa bicamada de glicerofosfolípidos (B). O colesterol insere-se na bicamada fosfolipídica com o grupo hidroxilo da posição três orientado na direcção da superfície aquosa, e alinhado com os resíduos carboxilos das ligações ésteres dos glicerofosfolípidos (com os quais interage através da formação de ligações por pontes de hidrogénio). A cadeia alifática posiciona-se paralelamente com as cadeias acilo dos ácidos gordos do glicerofosfolípido no centro da bicamada. O núcleo esteróide rígido interage, aproximadamente, com os primeiros nove átomos de carbono das cadeias acilo dos ácidos gordos dos glicerofosfolípidos, reduzindo a mobilidade destas cadeias a este nível e contribuindo para o aumento do grau de ordem da bicamada (adaptado de New, 1990a).

gordos dos glicerofosfolípidos, reduz a mobilidade destas cadeias a este nível contribuindo para o aumento do grau de ordem da membrana e diminuição da sua permeabilidade (New, 1990b; Lasic, 1993a; New, 1995). A presença de colesterol na bicamada revela-se igualmente importante pelo facto de, *in vivo*, diminuir o grau de adsorção de proteínas plasmáticas pelos lipossomas (Gabizon e Papahadjopoulos, 1992).

1.2.3.2. Estrutura dos lipossomas

Dadas as propriedades anfífilas das moléculas constituintes dos lipossomas, na presença de um excesso de água, tendem-se a formar estruturas em que os grupos polares se

encontram orientados para a superfície da estrutura, em contacto directo com a fase aquosa, e de forma a excluir o contacto das cadeias hidrofóbicas com a fase aquosa. O tipo de estruturas formadas em meio aquoso depende da temperatura e pH do sistema, da concentração da molécula anfifílica e, em particular, da sua forma molecular (Figura 1.4.) (Lasic, 1993e). No caso de fosfolípidos como a fosfatidilcolina hidrogenada de soja (e que é o constituinte principal dos lipossomas utilizados nesta dissertação), as zonas polares e apolares ocupam áreas análogas (conferindo uma forma cilíndrica à molécula), pelo que, em meio aquoso, agrupam-se sob a forma de uma bicamada lamelar. Já no caso de uma molécula com uma forma cónica como a fosfatidiletanolamina, em que a área da parte polar é inferior à da parte apolar (para valores de pH inferiores a 9,0), as estruturas que se formam são micelas invertidas (Figura 1.4.). Lípidos constituídos por uma única cadeia de ácidos gordos (caso dos lisofosfolípidos), em que a área da parte polar é superior à da parte apolar, formam micelas (Figura 1.4.) (Lasic, 1998).

Uma estrutura em bicamada lamelar é, por si, uma estrutura instável. Na sequência da adição de uma solução aquosa a um filme lipídico constituído, por exemplo, por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, o processo de hidratação dá-se mais rapidamente numa das monocamadas constituintes da bicamada (sinónimo da existência de um gradiente de concentração de água através da bicamada). Deste modo, há uma expansão da área das cabeças polares dos fosfolípidos da monocamada com maior grau de hidratação, relativamente à monocamada oposta, de que resulta a curvatura da bicamada fosfolipídica (Figura 1.5.) e a conseqüente formação de estruturas esféricas fechadas com um núcleo interno aquoso, i.e., lipossomas (Lasic, 1988; Lasic, 1992; Lasic, 1993c). Em concreto, na sequência deste processo, ocorre a formação de vesículas com mais do que uma bicamada fosfolipídica concêntrica, separadas entre si por uma fase aquosa, delimitando um núcleo aquoso, e que são designadas por lipossomas multilamelares.

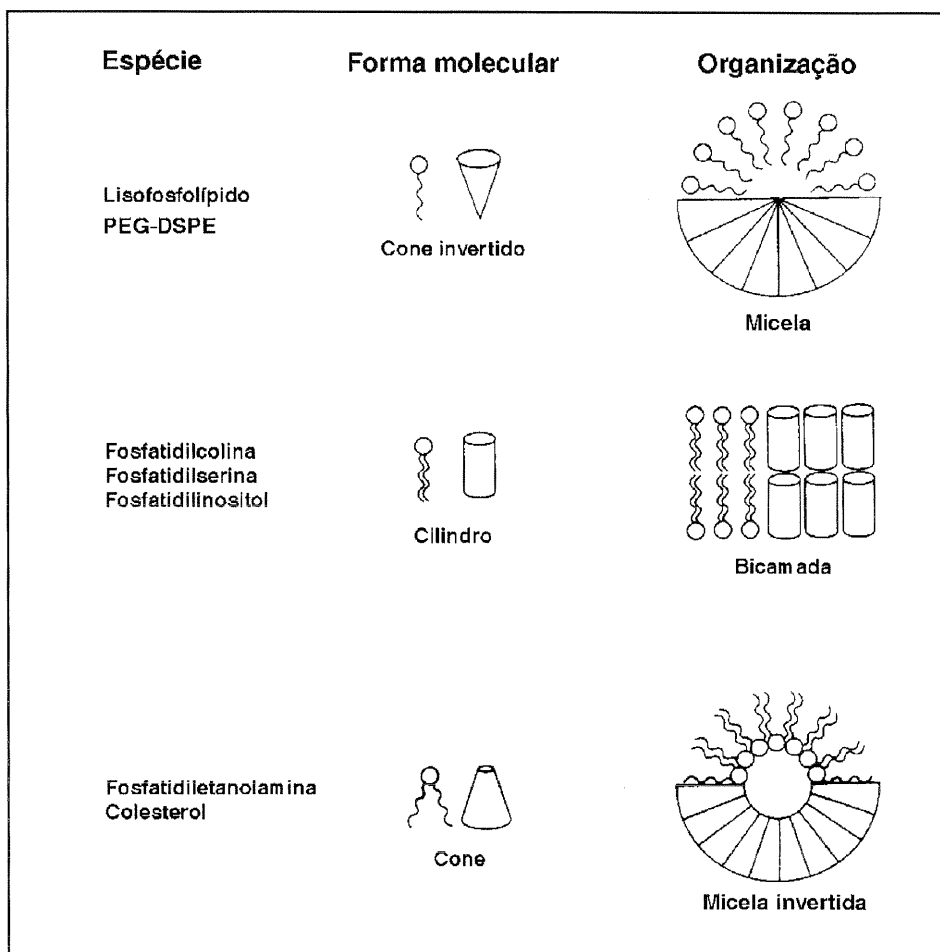


Figura 1.4. - Efeito da forma molecular dos lípidos na estrutura dos agregados anfifílicos. Consoante a forma molecular dos lípidos se assemelha a um cone invertido, cilindro ou cone, assim se organizam, em meio aquoso, sob a forma, respectivamente, de micelas, bicamadas ou micelas invertidas; PEG-DSPE, poli(etilenoglicol)-N-1,2-distearoilfosfatidiletanolamina (adaptado de Lasic, 1998).

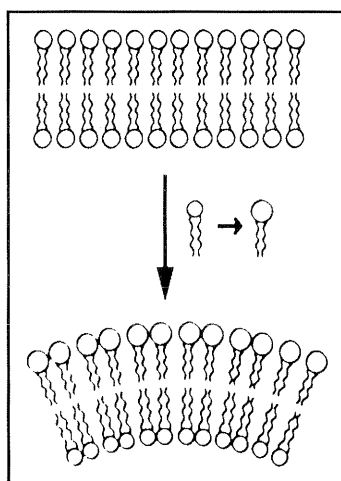


Figura 1.5. - Representação esquemática da indução de curvatura numa bicamada fosfolipídica lamelar. A assimetria da velocidade de hidratação numa bicamada fosfolipídica, determina uma expansão da área das cabeças polares dos fosfolípidos da monocamada com maior grau de hidratação, relativamente à monocamada oposta, de que resulta a curvatura da bicamada fosfolipídica (adaptado de Lasic, 1993c).

O método de preparação de lipossomas constitui um dos factores mais influentes da estrutura dos lipossomas. Assim, os vários tipos de lipossomas podem ser classificados em função do método de preparação (New, 1990c) ou de parâmetros estruturais, como o número de bicamadas e o diâmetro médio, que é, aliás, o critério adoptado neste trabalho. Os lipossomas multilamelares são estruturas heterogêneas em termos de diâmetro médio (igual ou superior a 400 nm) e, quando obtidos na sequência da hidratação de um filme lipídico, o volume interno aquoso é, aproximadamente, de 0,5 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ de lípido (Hope *et al.*, 1986). Estes lipossomas são em geral adequados para o transporte de moléculas hidrófobas que se dispõem ao nível dos componentes hidrófobos da bicamada fosfolipídica. Consoante o método de preparação, os lipossomas multilamelares podem dar origem a lipossomas unilamelares, formados apenas por uma única bicamada lipídica e destinados à vectorização de moléculas hidrófilas, e que, em função do seu tamanho, diferenciam-se em grandes ou pequenos (Figura 1.6.).

O termo *grande* corresponde a um intervalo de diâmetro médio de lipossomas em que não há um efeito visível do raio de curvatura da bicamada nas propriedades físicas dos lipossomas, tais como, a temperatura de transição entre o estado de gele e o estado líquido-cristalino, a distribuição de fosfolípidos entre os dois folhetos lipídicos de uma bicamada ou a estabilidade física do sistema lipossómico (New, 1990b; Barenholz e Crommelin, 1994).

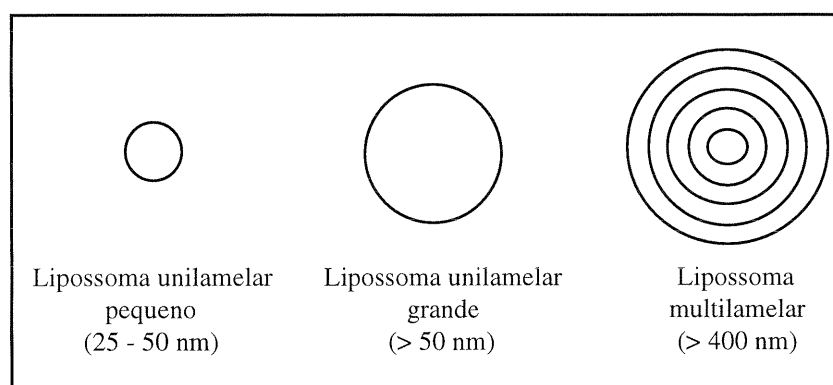


Figura 1.6. - Representação esquemática de três das estruturas de lipossomas mais comuns. Com base no número de bicamadas e no diâmetro médio, os lipossomas, estruturalmente, podem ser classificados em lipossomas unilamelares pequenos (25-50 nm), lipossomas unilamelares grandes (maiores ou iguais a 50 nm) e lipossomas multilamelares (maiores que 400 nm). As representações não estão desenhadas à escala e cada linha concêntrica representa uma bicamada fosfolipídica (adaptado de Barenholz e Crommelin, 1994).

Na literatura não existe uniformidade no que diz respeito ao valor de diâmetro médio que separa estes dois grupos de lipossomas, podendo ser, consoante os autores, de 50 (Hope *et al.*, 1986) ou de 100 nm (Barenholz e Crommelin, 1994). Neste trabalho, optar-se-á pelo valor de 50 nm para distinguir entre lipossomas unilamelares pequenos e grandes. Para a mesma concentração de lípido, o volume interno aquoso dos lipossomas unilamelares grandes é superior ao dos lipossomas unilamelares pequenos (Lasic, 1993d).

1.2.3.3. Estado físico da bicamada fosfolipídica

A bicamada fosfolipídica, dependendo da temperatura do sistema, pode existir sob a forma de vários fases físicas, que diferem entre si no grau de empacamento dos fosfolípidos. Este é um parâmetro determinante na estabilidade *in vitro* e *in vivo* dos lipossomas. Neste contexto distinguem-se frequentemente duas fases: as fases de gele e a líquida-cristalina (Figura 1.7.). A primeira corresponde a uma fase rígida, em que há um grande grau de ordenamento e reduzida mobilidade das cadeias acilo dos ácidos gordos, enquanto que a fase líquida-cristalina é mais fluida devido a uma maior mobilidade das referidas cadeias acilo (Storm e Woodle, 1998). A temperatura que corresponde à passagem de uma fase para outra designa-se por temperatura de transição de fase. Esta pode variar entre -20 e 60°C (Talsma, 1991), em função da natureza dos fosfolípidos que compõem a bicamada e, mais concretamente, do comprimento e do grau de saturação das cadeias de ácidos gordos e da

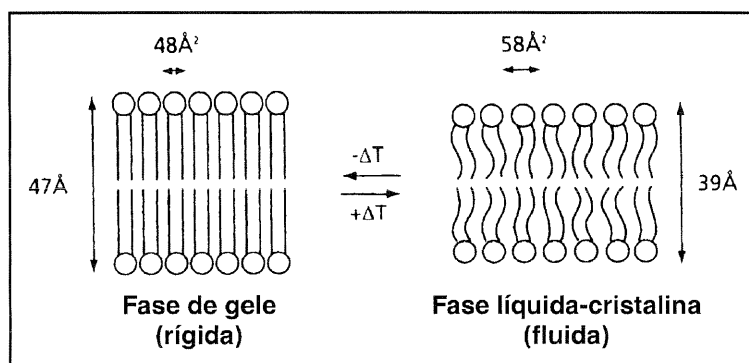


Figura 1.7. - Fases físicas que uma bicamada fosfolipídica pode adoptar em função da temperatura do sistema. A fase de gele corresponde a uma fase rígida, em que há um grande grau de ordenamento das cadeias acilo dos ácidos gordos, enquanto que a fase líquida-cristalina é mais fluida devido a uma maior mobilidade das referidas cadeias acilo (adaptado de Storm e Woodle, 1998).

natureza dos grupos polares (Lasic, 1993e). De referir, por exemplo, que a presença de ácidos gordos de cadeia reduzida e/ou poli-insaturados, sobretudo ao nível do centro da cadeia e com insaturações cis, contribuem para valores reduzidos de temperatura de transição de fase (New, 1995). De uma maneira geral, uma bicamada fluida é mais permeável a solutos do que uma bicamada rígida (Storm e Woodle, 1998), o que, numa perspectiva da estabilização física e biológica dos lipossomas como vectores de fármacos, torna aconselhável a selecção de fosfolípidos com uma temperatura de transição de fase superior à temperatura fisiológica.

1.2.4. Métodos de preparação de lipossomas

Actualmente, encontra-se ao dispor dos investigadores uma grande variedade de técnicas de preparação de lipossomas (revistos por New, 1990b; Gregoriadis, 1993; Lasic, 1993d), dependendo a selecção de cada uma delas do fim específico a que se destinam os lipossomas.

Os métodos de preparação de lipossomas são classificados segundo diferentes critérios, consoante os autores. No presente trabalho adoptou-se a classificação apresentada por New (1990c), cujo o critério de classificação é baseado no modo de dispersão dos lípidos na fase aquosa. Assim salienta-se a dispersão física, a dispersão de duas fases e a solubilização de detergentes.

Nos métodos de preparação por dispersão física, os lípidos são secos a partir de um solvente orgânico num suporte sólido (normalmente as paredes do recipiente de preparação), após o que são dispersos em fase aquosa por agitação (por exemplo, agitação em vórtex), resultando a formação de lipossomas multilamelares.

No conjunto de métodos de preparação que recorre à dispersão de duas fases, os lípidos são primeiramente dissolvidos num solvente orgânico, ao qual é posteriormente adicionado o composto a encapsular dissolvido numa solução aquosa. Os lípidos dispõem-se na interface entre as duas fases na forma de uma monocamada. Dentro deste grupo de métodos de preparação é possível distinguir três categorias: aquela que envolve a utilização

de um solvente orgânico miscível com a fase aquosa; aquela em que a fase orgânica é imiscível com a fase aquosa, encontrando-se esta última em largo excesso relativamente à primeira; e finalmente, aquela em que a fase orgânica é imiscível e se encontra em largo excesso em relação à fase aquosa.

Na terceira classe de métodos de preparação de lipossomas referidos por New (1990c), os fosfolípidos são solubilizados num meio aquoso por recurso à utilização de moléculas de detergente, dando origem à formação de micelas mistas. Segue-se a remoção do detergente (por exemplo, por diálise) que leva a um cada vez maior enriquecimento das micelas em fosfolípidos o que determina, conseqüentemente, a formação espontânea de lipossomas unilamelares.

No presente trabalho foram utilizados lipossomas unilamelares grandes, preparados a partir de lipossomas multilamelares, os quais, por sua vez, são obtidos por dispersão física. Após secagem da mistura lipídica a partir de um solvente orgânico, procede-se à hidratação daqueles com solução tampão adequada, mediante agitação mecânica e a uma temperatura (65°C) superior à temperatura de transição do componente com temperatura de transição de fase mais elevada e que, no caso, é a fosfatidilcolina hidrogenada de soja (55°C). Seguidamente, e com o objectivo de obter uma população de lipossomas unilamelares grandes, homogénea em termos de diâmetro médio, procede-se a uma extrusão (o dispositivo utilizado para este efeito toma o nome de extrusor). Este processo consiste na passagem de uma suspensão de lipossomas, de forma repetida e sequencial, através de membranas de policarbonato com diferentes diâmetros de poro (escolhidos em função do tamanho final pretendido), em condições de elevada pressão e a uma temperatura superior à temperatura de transição da fosfatidilcolina hidrogenada de soja (Olson *et al.*, 1979; Hope *et al.*, 1985). Para lipossomas de diâmetro médio entre 60 e 100 nm, o volume interno aquoso varia, aproximadamente, entre 1 e 3 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ de fosfolípido (Hope *et al.*, 1985).

1.2.5. Encapsulação de fármacos em lipossomas

O nível e o grau de encapsulação (associação) de fármacos ou de moléculas marcadoras (sondas) a lipossomas depende do seu carácter hidrofílico, hidrofóbico ou anfifílico. Na Figura 1.8. representa-se a distribuição na estrutura dos lipossomas destas três categorias de substâncias em função do seu coeficiente de partilha octanol:água ($\log P_{\text{oct}}$).

De uma maneira geral, as substâncias cuja retenção no interior de lipossomas se torna mais favorável, são aquelas que apresentam valores de coeficiente de partilha octanol:água muito baixos ou muito elevados (Defrise-Quertain *et al.*, 1984). Assim se justifica, por

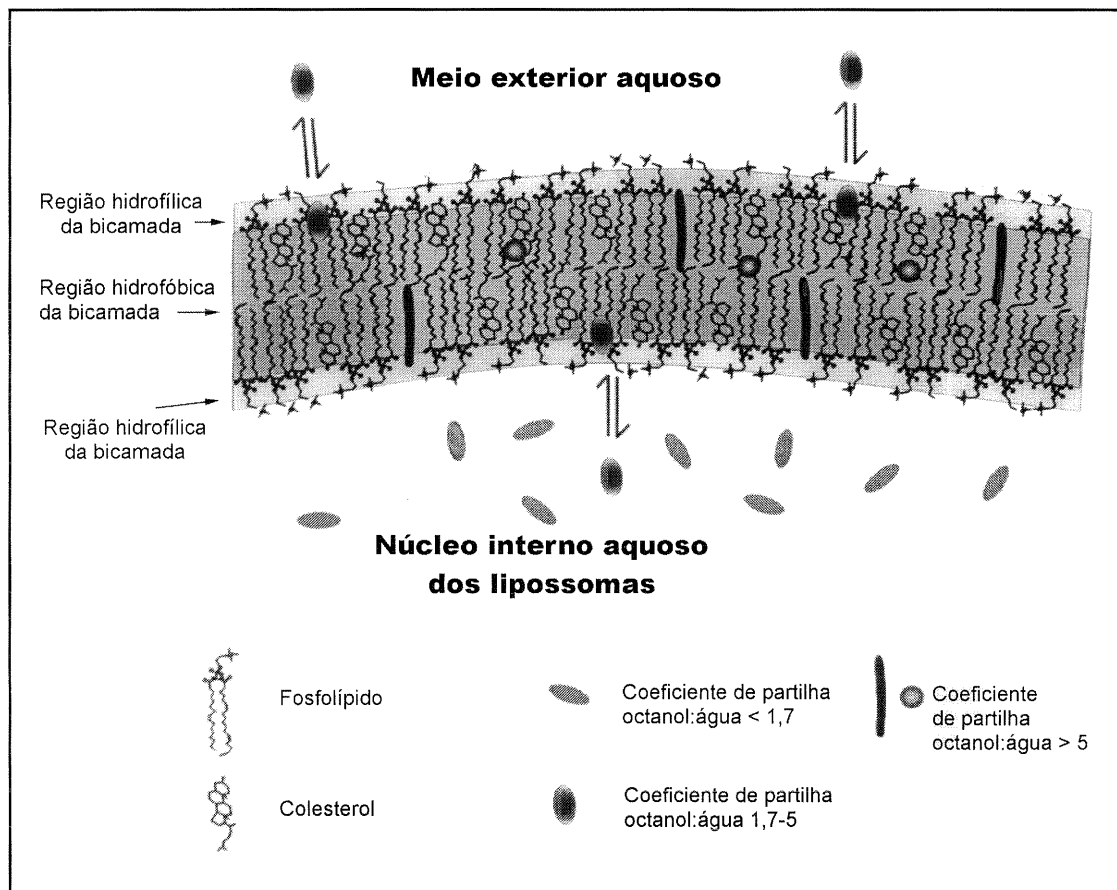


Figura 1.8. - Esquemática da relação entre os níveis de associação de moléculas a lipossomas em função do coeficiente de partilha octanol:água. Os compostos hidrofílicos, com um coeficiente de partilha octanol:água reduzido (inferior a 1,7) não interagem com os lípidos da bicamada, sendo a sua distribuição confinada ao núcleo interno aquoso dos lipossomas. As moléculas hidrofóbicas, com um elevado coeficiente de partilha octanol:água (superior a 5), distribuem-se ao nível da parte hidrofóbica da bicamada fosfolipídica. As moléculas anfifílicas, com um coeficiente de partilha octanol:água intermédio entre 1,7 e 5, distribuem-se entre a bicamada fosfolipídica e a fase aquosa que a rodeia (desenho gentilmente cedido pela Dra. Theresa M. Allen).

exemplo, que a encapsulação da citosina arabinósido ($\log P_{\text{oct}} = -0,79$) em lipossomas possa apresentar um tempo de semi-vida de libertação, num meio com 25% de plasma humano e a 37°C, da ordem de dias, parâmetro que é também função da composição lipídica (Allen *et al.*, 1992). Substâncias anfifílicas são, à partida, pouco retidas pelos lipossomas, no entanto, e para o caso de substâncias que sejam ácidos ou bases fracas, este problema pode ser ultrapassado pela manipulação do pH ou da composição química do compartimento interno aquoso dos lipossomas. Neste contexto, podem então distinguir-se dois tipos de técnicas de encapsulação de fármacos em lipossomas: a encapsulação passiva ou a encapsulação activa (também designada por encapsulação remota).

A encapsulação passiva é um processo físico simples em que, no caso de uma substância hidrofílica, ela é solubilizada num meio aquoso adequado com que posteriormente se hidrata um filme lipídico seco. A encapsulação ocorre na sequência do processo de hidratação e durante a formação espontânea dos lipossomas. No caso de uma substância hidrofóbica, esta é incorporada no solvente orgânico em que se efectua a mistura dos componentes lipídicos. Segue-se uma fase de secagem desta mistura, e posterior hidratação em solução aquosa, na sequência da qual ocorre a formação espontânea de lipossomas e incorporação da referida substância no seio da região hidrofóbica da bicamada fosfolipídica.

No caso da encapsulação activa, a encapsulação da substância ocorre após a formação dos lipossomas. Substâncias que sejam bases fracas, com carácter anfifílico e neutras (como por exemplo, a doxorubicina ou a vincristina) são susceptíveis de atravessar a bicamada fosfolipídica de lipossomas pré-formados na sequência da existência de um gradiente crescente no sentido do interior dos lipossomas: de pH (Mayer *et al.*, 1989; Mayer *et al.*, 1990; Boman *et al.*, 1993), de sulfato de amónio (Haran *et al.*, 1993; Bolotin *et al.*, 1994), de sulfato de manganésio (Cheung *et al.*, 1998) ou de citrato de amónio (Allen *et al.*, 1995c). No interior do lipossoma, a substância encapsulada adquire carga eléctrica, que impede a sua difusão através da bicamada, reagindo depois com o respectivo contra-íão. De referir que o desenvolvimento de gradientes transmembranares de acetato de cálcio permite a encapsulação activa de substâncias que sejam ácidos fracas, com carácter anfifílico, como

por exemplo, a 5(6)-carboxifluoresceína ou o ácido nalidíxico (Clerc e Barenholz, 1995).

No trabalho apresentado nesta dissertação efectuou-se a encapsulação activa de doxorubicina ($pK_a = 8,25$) através da utilização de um gradiente de sulfato de amónio, cujo fundamento se passa a descrever (Figura 1.9.). Na sequência da criação de um gradiente de sulfato de amónio entre o exterior e o interior dos lipossomas (a concentração de $(NH_4)_2SO_4$ no interior dos lipossomas é muito superior à do meio exterior), e em condições de elevada permeabilidade da bicamada fosfolipídica ($65^\circ C$), ocorre uma rápida libertação de menos de 1% de NH_4^+ sob a forma de amónia (NH_3), devido ao seu elevado coeficiente de permeabilidade ($1,3 \times 10^{-1} \text{ cm/s}$). Por cada molécula de NH_3 que se difunde, existe um protão que permanece no interior dos lipossomas, formando-se assim um gradiente de pH em que o interior dos lipossomas se torna mais ácido que o meio exterior. Daqui resulta,

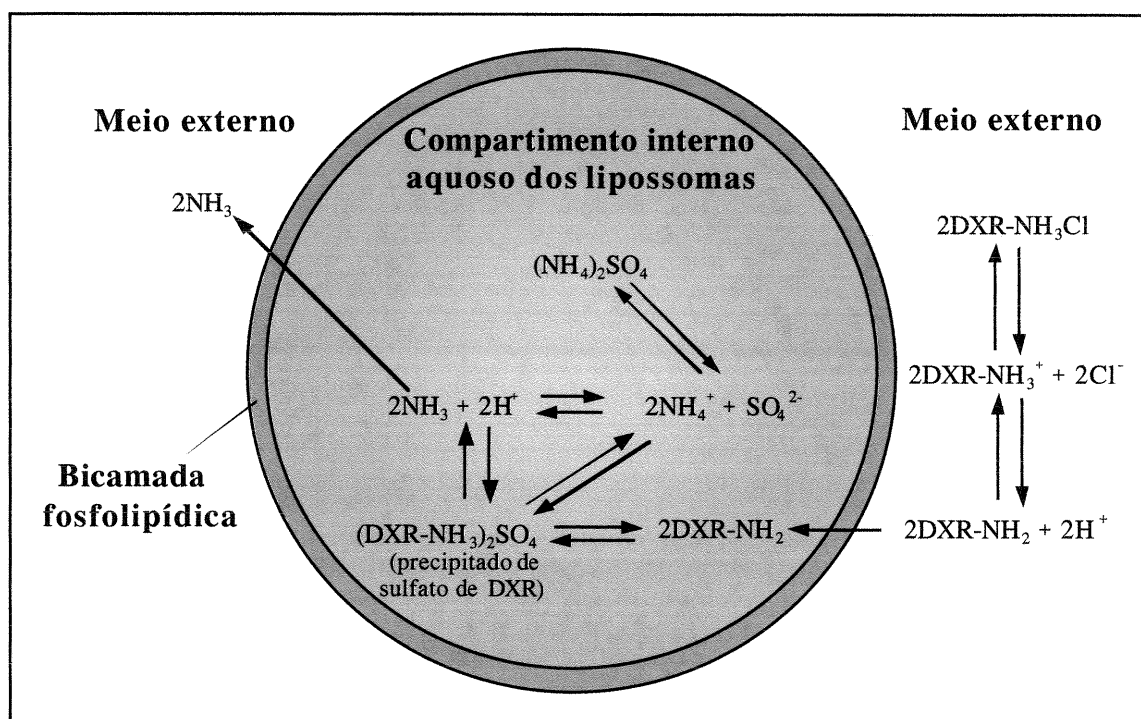


Figura 1.9. - Representação da encapsulação activa de doxorubicina em lipossomas através de um gradiente de sulfato de amónio. Na sequência da criação de um gradiente de sulfato de amónio entre o exterior e o interior dos lipossomas (a concentração de $(NH_4)_2SO_4$ no interior dos lipossomas é muito superior à do meio exterior), ocorre uma acidificação do interior dos lipossomas. Daqui resulta a difusão da forma neutra da doxorubicina ($DXR-NH_2$) para o interior daqueles, onde se dá a sua protonação (forma não permeável) e subsequente reacção com o excesso de ião sulfato aí existente. Forma-se, assim, de forma rápida e eficaz, um precipitado de sulfato de doxorubicina $((DXR-NH_3)_2SO_4)$ estável ao nível do núcleo aquoso dos lipossomas (adaptado de Bolotin, 1994).

então, a difusão da forma neutra da doxorrubicina (DXR-NH₂) para o interior dos lipossomas, onde se dá a sua protonação (forma não permeável) e subsequente reacção com o excesso de ião sulfato aí existente (e que possui um reduzido coeficiente de permeabilidade; $< 10^{-12}$ cm/s). Forma-se, assim, um precipitado de sulfato de doxorrubicina ((DXR-NH₂)₂SO₄) estável ao nível do compartimento interno aquoso dos lipossomas (Lasic *et al.*, 1992; Lasic *et al.*, 1995). A acumulação da doxorrubicina protonada no interior dos lipossomas determina, sequencialmente, o aumento de pH neste meio, com consequente formação de NH₃, saída deste para o meio externo, nova acidificação do interior dos lipossomas e entrada de mais fármaco na sua forma neutra. Este ciclo é regenerado até que se tenha dado o efluxo de todos os iões NH₄⁺ sob a forma de NH₃. Nestas condições, a acumulação de doxorrubicina no interior dos lipossomas é rápida (ocorre em cerca de 30-60 min), podendo exceder a sua concentração no meio externo em cerca de cem vezes. Desta forma, conseguem-se eficiências de encapsulação de doxorrubicina superiores a 95% (Haran *et al.*, 1993; Bolotin *et al.*, 1994).

Independentemente do método de encapsulação, e numa perspectiva de utilização dos lipossomas como vectores de fármacos, segue-se finalmente uma fase de remoção do material não encapsulado, por exemplo, por ultracentrifugação, diálise ou cromatografia de exclusão molecular.

1.3. LIPOSSOMAS EM TERAPIA ANTITUMORAL

1.3.1. Lipossomas clássicos ou convencionais

Os lipossomas desprovidos superficialmente de qualquer componente susceptível de poder contribuir para tempos de circulação sanguínea prolongados, são designados por lipossomas clássicos ou convencionais (Figura 1.1.). Mediante administração intravenosa, a interacção e adsorção de proteínas plasmáticas à superfície de lipossomas convencionais

(num processo designado por opsonização) pode, por um lado, comprometer a integridade dos lipossomas com o conseqüente efluxo do seu conteúdo (Allen e Cleland, 1980) e, por outro lado, contribuir para o rápido reconhecimento e remoção dos lipossomas da circulação pelas células do sistema monocítico fagocitário (Devine e Marjan, 1997; Semple *et al.*, 1998). Na realidade, os primeiros estudos realizados *in vivo* com fármacos encapsulados em lipossomas convencionais revelaram um padrão de distribuição diferente do dos respectivos fármacos livres (não encapsulados em lipossomas). Por um lado, registou-se um aumento do tempo de circulação sanguínea dos primeiros e, por outro lado, observou-se um aumento acentuado da sua acumulação nos macrófagos do fígado e do baço, relativamente aos respectivos fármacos livres (Gregoriadis, 1973; Juliano e Stamp, 1978; Freise *et al.*, 1982). De referir que, actualmente, este padrão de distribuição natural dos lipossomas convencionais constitui a base para o tratamento das infecções naquela população celular, como por exemplo, a leishmaniose (Kole *et al.*, 1994).

Com o intuito de poder estender a aplicação de lipossomas ao tratamento de outras populações celulares, que não apenas as do sistema monocítico fagocitário, era importante diminuir a acumulação de lipossomas neste tipo de células. Entre outras estratégias, testou-se a pré-saturação do sistema monocítico fagocitário com sulfato de dextrano (Souhami *et al.*, 1981) ou com lipossomas de 100 nm e incorporando o derivado 6-aminomanose do colesterol (Proffitt *et al.*, 1983). Neste último estudo, a administração de uma segunda dose de lipossomas traduziu-se num aumento significativo da sua acumulação tumoral. Este tipo de estratégia, tendo o inconveniente de poder comprometer a funcionalidade das células do sistema monocítico fagocitário, as quais são um importante elemento de defesa do nosso organismo (Allen, 1988), não deixou de evidenciar o grande potencial que decorre de uma diminuição da acumulação de lipossomas naquele tipo de células. Tornou-se, pois, importante compreender alguns dos mecanismos que regulam a biodistribuição dos lipossomas.

Ao nível do compartimento vascular, a farmacocinética dos lipossomas

convencionais apresenta uma grande dependência da dose de lipossomas administrada (Allen e Hansen, 1991). Para doses reduzidas (0,1 a 0,5 μmol de fosfolípido/ratinho), a eliminação é bifásica (bi-exponencial), e inclui uma fase inicial de eliminação muito rápida (designada por fase α) e uma segunda fase de eliminação bastante mais lenta (designada por fase β). A fase α é caracterizada por uma acentuada acumulação de lipossomas (cerca de 80% dos lipossomas administrados, em 30-60 min) ao nível das células do sistema monocítico fagocitário do fígado (em especial as células de Kupffer; Roerdink *et al.*, 1984) e do baço (Allen e Hansen, 1991).

Este tipo de eliminação bi-exponencial sugere a ocorrência de dois mecanismos de eliminação distintos. A fase α corresponde ao reconhecimento e internalização dos lipossomas pelos macrófagos do fígado e do baço, num processo rápido, de elevada afinidade e facilmente saturável. A fase de eliminação β é um processo de eliminação mais lento e que se pensa corresponder à reciclagem dos locais de ligação dos lipossomas aos macrófagos e/ou recrutamento de novos macrófagos (Allen e Hansen, 1991). Com o aumento das doses até 1 μmol de fosfolípido/ratinho, a fase α tende a desaparecer e diminui a acumulação de lipossomas nas células do sistema monocítico fagocitário do fígado e do baço. Para doses da ordem de 10 μmol de fosfolípido/ratinho, o perfil de eliminação sanguínea dos lipossomas passa a ser linear em função do tempo (à escala logarítmica) e dominado pela fase de eliminação lenta (Allen e Hansen, 1991).

Para além da dose, a farmacocinética dos lipossomas convencionais é afectada por outros parâmetros, como sejam, o tamanho e a composição lipídica dos lipossomas. Na realidade, verifica-se que o aumento do tamanho dos lipossomas convencionais acelera a sua eliminação vascular, a qual é promovida, fundamentalmente, pelas células do sistema monocítico fagocitário (Abra e Hunt, 1981). O aumento do tamanho dos lipossomas para valores da ordem dos 2 μm pode, todavia, constituir uma forma de promover a sua acumulação selectiva ao nível dos pulmões (por simples retenção física), relativamente a populações de lipossomas de tamanho mais reduzido (Hunt *et al.*, 1979). De referir

também, que lipossomas carregados negativamente são fagocitados em maior extensão pelas células macrofágicas do que os lipossomas neutros (Fidler *et al.*, 1988). Assim, a administração intravenosa de imunomoduladores encapsulados em lipossomas grandes e carregados negativamente é susceptível de activar os macrófagos dos alvéolos pulmonares de animais (Key *et al.*, 1982), estratégia que se revelou terapeuticamente eficaz no tratamento de metástases pulmonares (Lopez-Berestein *et al.*, 1984; Fidler *et al.*, 1989).

Os lipossomas de tamanho inferior a 100 nm, por seu turno, podem interagir quer com as células de Kupffer (na sua passagem pelos sinusóides hepáticos), quer com os hepatócitos (após extravasão para o espaço extravascular através das fenestrações do endotélio) (Scherphof *et al.*, 1997). De salientar também que, as fenestrações hepáticas podem também ser atravessadas por lipossomas com diâmetro médio três a quatro vezes superior ao diâmetro daquelas, desde que, em termos de composição, sejam fluidos e contenham fosfatidilserina (Scherphof *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1999). Neste contexto, a composição dos lipossomas pode também influenciar a sua distribuição relativa entre o fígado e o baço. Assim, por exemplo, lipossomas com fosfatidilserina têm bastante mais afinidade para o fígado do que lipossomas com fosfatidilglicerol, passando-se o inverso no baço. Pensa-se que este comportamento possa ser regulado por diferentes padrões de opsonização dos lipossomas, de que decorrem diferentes graus de afinidade para diferentes populações de macrófagos (Scherphof *et al.*, 1997).

Estudos *in vitro* demonstraram que, embora a incorporação de fosfolípidos carregados negativamente, como por exemplo, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol ou ácido fosfatídico, aumentasse a extensão da associação e internalização dos lipossomas por linhas celulares macrofágicas e também tumorais (Heath *et al.*, 1985; Allen *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1992), *in vivo* e após administração intravenosa, eram responsáveis por uma rápida eliminação sanguínea (Gabizon e Papahadjopoulos, 1992). No que diz respeito ao mecanismo subjacente a esta eliminação, Gabizon e Papahadjopoulos (1992) especulam entre um processo mediado por receptores ou a uma elevada afinidade destes fosfolípidos negativos pelo ião Ca^{2+} , que facilita o contacto intermembranar e correspondente fusão dos

lipossomas com macrófagos.

Uma observação importante foi a de que a utilização de fosfolípidos com temperatura de transição de fase elevada (caso da distearoilfosfatidilcolina) e de lipossomas com diâmetros médios aproximados de 100 nm, determina um aumento significativo dos seus tempos de circulação sanguínea, que é, aliás, concomitante, com a diminuição da sua acumulação nas células do sistema monocítico fagocitário (Allen *et al.*, 1989; Gabizon e Papahadjopoulos, 1992). Estes efeitos decorrem da redução do grau de opsonização dos lipossomas e/ou interações não específicas com as células (Gabizon e Papahadjopoulos, 1992). Como referido anteriormente, a incorporação de colesterol no seio da bicamada fosfolipídica revelou-se igualmente importante na diminuição da extensão de acumulação pelo fígado e baço, decorrente de uma melhoria da estabilidade física dos lipossomas (Gregoriadis e Davis, 1979; Kirby *et al.*, 1980; Patel *et al.*, 1983).

Com o objectivo de, mediante administração intravenosa, prolongar os tempos de circulação dos lipossomas no sangue e, assim, alcançar outras populações celulares, que não apenas as do sistema monocítico fagocitário, o conjunto dos conhecimentos aqui apresentados, levou à selecção de lipossomas com diâmetro médio aproximado de 100 nm, rígidos e de reduzida permeabilidade (em resultado da presença de distearoilfosfatidilcolina ou esfingomielina², e colesterol). Lipossomas convencionais com estas características e administrados em doses elevadas, constituem a base da utilização dos lipossomas de daunorrubicina, DaunoXome^{®3}, contra tumores sólidos (Forssen *et al.*, 1992; Forssen *et al.*, 1996; Forssen, 1997), e aprovado clinicamente para o tratamento do sarcoma de Kaposi (Gill *et al.*, 1995), dos lipossomas de vincristina, também em terapia antitumoral e em fase de experimentação pré-clínica (Webb *et al.*, 1998) e clínica (Gelmon *et al.*, 1999) e dos lipossomas de anfotericina B, AmBisome^{®4}, no tratamento de infecções sistémicas (Janknegt *et al.*, 1992; Clemons e Stevens, 1993; van Etten *et al.*, 1993; Russo *et al.*, 1996).

² A esfingomielina é um esfingofosfolípido (derivado da ceramida) e que é utilizado como um agente rigidificante da membrana lipídica dos lipossomas (Lasic, 1993a).

³ Marca registrada da NeXstar Pharmaceuticals (San Dimas, CA).

⁴ Marca registrada da Vestar Inc. (San Dimas, CA).

1.3.2. Lipossomas estabilizados estereamente

A constatação, simples, da capacidade dos glóbulos vermelhos para circularem no sangue sem oposição das células macrofágicas, fruto da existência à sua superfície de glicolípidos dotados de resíduos de ácido siálico, com carácter hidrofílico e carga negativa, revelou-se determinante para o desenvolvimento dos lipossomas estabilizados estereamente. Estes lipossomas distinguem-se dos lipossomas convencionais por possuírem à sua superfície grupos hidrofílicos que contribuem de forma decisiva para o aumento do tempo de circulação sanguínea, e concomitante diminuição da velocidade e da extensão de acumulação nas células do sistema monocítico fagocitário. Por esta razão, os lipossomas estabilizados estereamente são também designados por lipossomas Stealth^{®5} (Allen, 1989). De entre as substâncias susceptíveis de conferir aos lipossomas tais propriedades, destacam-se os glicolípidos, e em particular o monosialogangliósido, e o poli(etilenoglicol) (PEG) que a seguir se discutem de forma breve (Figura 1.1.).

1.3.2.1. Lipossomas estabilizados estereamente com monosialogangliósido

O desenvolvimento de lipossomas com uma composição da bicamada semelhante à dos glóbulos vermelhos, corresponde ao início do reconhecimento do potencial de utilização dos lipossomas na terapia antitumoral. A rigidificação da membrana lipossómica, através da incorporação de esfingomiélin, a par da incorporação de 7 a 15 mol % (do total de fosfolípido) de monosialogangliósido (Figura 1.10.) em lipossomas com diâmetro médio aproximado de 100 nm, aumentaram significativamente os seus tempos de circulação sanguínea. Simultaneamente, observou-se uma diminuição da rapidez e da extensão de acumulação no fígado e no baço (Allen e Chonn, 1987; Allen *et al.*, 1989) e um aumento da estabilidade física do sistema lipossómico (Allen *et al.*, 1985; Allen *et al.*, 1989). A título de

⁵ Marca registada da Alza Corporation (Mountain View, CA).

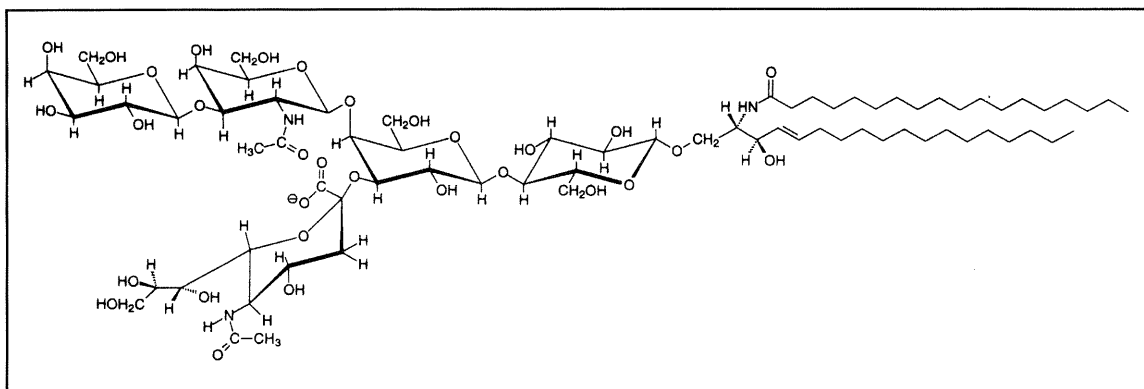


Figura 1.10. - Estrutura química do monosialogangliósido. O monosialogangliósido é um glicolípido que contém um oligossacarídeo hidrofílico que se liga por ligações glicosídicas quer a um único resíduo de ácido siálico (carregado negativamente ao pH fisiológico) quer a uma ceramida hidrofóbica, a qual é responsável pela *ancoragem* deste composto na bicamada fosfolipídica dos lipossomas (adaptado de Silerud *et al.*, 1978).

exemplo refira-se que, decorridas 24 h após a administração intravenosa de lipossomas, o somatório da acumulação no fígado e no baço de lipossomas formados por fosfatidilcolina de ovo:esfingomiéline:colesterol:monosialogangliósido na razão molar de 1:1:1:0,2, é cerca de três vezes inferior relativamente à acumulação de lipossomas formados por fosfatidilcolina de ovo:colesterol na razão molar de 2:1. Como esperado, observou-se um claro aumento do tempo de semi-vida de eliminação sanguínea da primeira formulação (16 a 24 h) relativamente à segunda formulação, que apresentou um valor da ordem das 2 h (Allen e Chonn, 1987; Allen, 1994). O aumento do tempo de circulação sanguínea destas novas formulações de lipossomas traduziu-se num aumento da acumulação em tumores implantados em ratinhos, relativamente a formulações de rápida eliminação sanguínea (Gabizon e Papahadjopoulos, 1988; Gabizon *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1992). Outros glicolípido não se revelaram tão eficazes no aumento dos tempos de circulação sanguínea dos lipossomas, embora o fosfatidilinositol tenha demonstrado algum efeito (Gabizon e Papahadjopoulos, 1988; Allen *et al.*, 1989; Allen *et al.*, 1991a; Gabizon e Papahadjopoulos, 1992).

Apesar da carga negativa de certos fosfolípidos ser o principal factor responsável pela rápida eliminação sanguínea de lipossomas, no caso do monosialogangliósido isso não parece acontecer. Neste, a carga negativa distancia-se da superfície da bicamada em cerca de

1 nm e encontra-se estereamente protegida por volumosos grupos hidrofílicos (cadeias de açúcares neutros que se distanciam 2,5 nm da superfície da bicamada). Adicionalmente, existem evidências de que o grupo carboxílico do resíduo de ácido siálico forma um complexo com os grupos hidroxilo dos grupos galactose terminais (Gabizon e Papahadjopoulos, 1988; Allen *et al.*, 1989). Nestas circunstâncias, não só se encontram impedidas as interacções inespecíficas entre a carga negativa deste lípido e as proteínas circulantes ou existentes à superfície de células, como também se encontra dificultado o acesso das proteínas plasmáticas à superfície da membrana dos lipossomas. De referir que, a presença da carga negativa no monosialogangliósido é determinante na inibição da agregação dos lipossomas, que poderia conduzir ao aumento da sua velocidade de eliminação sanguínea (Gabizon e Papahadjopoulos, 1992). A presença de monosialogangliósido nos lipossomas, todavia, não é susceptível de inibir a opsonização de lipossomas mediada pela fosfatidilserina (Allen *et al.*, 1991a; Lee *et al.*, 1992).

Um dos aspectos importantes descobertos na sequência da incorporação do monosialogangliósido em lipossomas, é o facto do perfil de eliminação sanguínea destes ser linear em função do tempo (à escala logarítmica) e independente da dose (Allen e Hansen, 1991). Com a incorporação do monosialogangliósido em lipossomas, passou igualmente a haver uma maior versatilidade na gama de diâmetros médios de lipossomas susceptível de utilização por via intravenosa. Concretamente, lipossomas com 200 a 400 nm possuem, ainda, um tempo de circulação sanguínea significativamente prolongado (cerca de 4 a 7 vezes superior ao dos mesmos lipossomas sem monosialogangliósido; Allen *et al.*, 1989). A acumulação nos hepatócitos aparece aumentada apenas para valores de diâmetro médio inferiores a 80 nm (Allen *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1992). Para valores de diâmetro médio superiores a 300 nm é de assinalar o aumento da acumulação no baço em detrimento do fígado, em virtude dos lipossomas ficarem retidos na rede de células reticulares e macrófagos (Liu *et al.*, 1991).

O conjunto de estudos desenvolvidos com lipossomas constituídos por monosialogangliósido permitiu estabelecer alguns princípios importantes, tendo trazido,

definitivamente, um renovado vigor a este sistema. No entanto, a possibilidade da utilização de monosialogangliósido poder desencadear respostas imunogénicas, resultando numa rápida eliminação dos lipossomas da corrente sanguínea (Liu *et al.*, 1995a; Liu *et al.*, 1995b), o elevado custo de obtenção e as dificuldades de purificação, de acordo com as exigentes normas de produção de medicamentos, levaram a que este glicolípido fosse substituído por um derivado lipídico do PEG.

1.3.2.2. Lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol)

O grande potencial de utilização do PEG foi pela primeira vez demonstrado por Abuchowski *et al.* (1977), os quais observaram que o acoplamento covalente de PEG, com um peso molecular de 1900 ou de 5000 Da, à albumina sérica bovina é susceptível de tornar esta proteína não imunogénica e de aumentar o seu tempo de circulação sanguínea. Esta descoberta foi aplicada aos lipossomas apenas no início da década de 90 (Blume e Cevc, 1990; Klibanov *et al.*, 1990; Allen *et al.*, 1991b; Senior *et al.*, 1991), depois da utilização de monosialogangliósido ter revelado a importância de dotar a superfície dos lipossomas com carácter hidrofílico. O aumento dos tempos de circulação sanguínea dos lipossomas com PEG e com tamanhos aproximados de 100 nm, é um dos factores determinantes para o aumento da sua acumulação tumoral e conseqüente aumento da eficácia terapêutica do fármaco que veiculam, relativamente ao fármaco livre ou encapsulado em lipossomas convencionais (Papahadjopoulos *et al.*, 1991; Gabizon *et al.*, 1994).

A incorporação das longas cadeias hidrofílicas de PEG à superfície da membrana dos lipossomas impunha a sua derivatização com um grupo hidrofóbico. De entre os vários grupos testados, a conjugação através de uma ligação carbamato com o átomo de azoto do grupo etanolamina da 1,2-distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), formando o conjugado PEG-DSPE⁶ (Figura 1.11.), revelou-se a mais eficaz em termos da sua capacidade para diminuir a velocidade e a extensão de acumulação dos lipossomas pelas células do sistema

⁶ No decorrer do texto, o termo *PEG* será utilizado como sinónimo de *PEG₂₀₀₀-DSPE*.

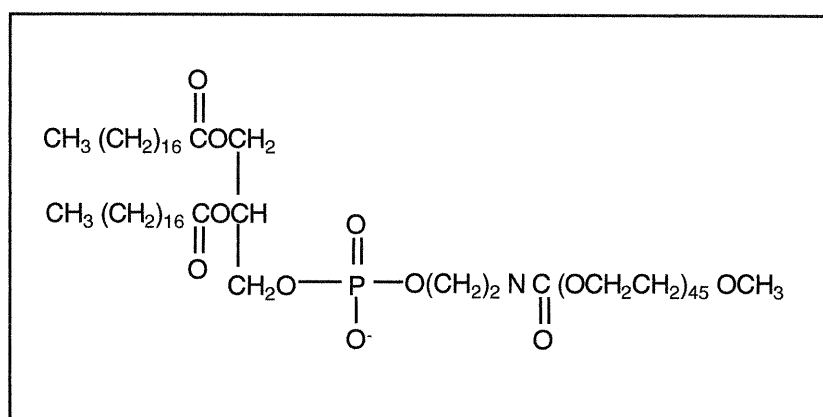


Figura 1.11. - Estrutura química do 1,2-distearoilfosfatidiletanolamina-N-poli(etilenoglicol)2000 (PEG-DSPE). O poli(etilenoglicol) é conjugado com o átomo de azoto do grupo etanolamina da distearoilfosfatidiletanolamina, através de uma ligação carbamato. Esta molécula, a pH fisiológico, possui uma carga negativa no grupo fosfato. O poli(etilenoglicol) é constituído por 45 grupos etilenoglicol, o que confere a este polímero um peso molecular aproximado de 2000 Da (adaptado de Parr *et al.*, 1994).

monocítico fagocitário (Allen *et al.*, 1991b; Woodle *et al.*, 1992b). A disparidade de resultados obtida entre as várias *âncoras* hidrofóbicas testadas (como o colesterol ou o dipalmitoilglicerol) e a 1,2-distearoilfosfatidiletanolamina, pode dever-se à menor capacidade de associação das primeiras aos lipossomas ou à própria clivagem da ligação que as unia ao PEG, ao longo do tempo (Allen *et al.*, 1991b).

Em termos do peso molecular e da concentração de PEG-DSPE a incorporar nos lipossomas, foi observado que os tempos máximos de circulação sanguínea dos lipossomas se obtêm com a utilização de PEG com um peso molecular aproximado entre 1000 a 2000 Da, numa concentração aproximada de 5-7 mol% em relação ao fosfolípido (Allen *et al.*, 1991b; Maruyama *et al.*, 1992; Woodle *et al.*, 1992b). O efeito obtido, nestas condições, é semelhante ao obtido com a incorporação nos lipossomas de 10 mol % (em relação ao fosfolípido) de monosialogangliósido (Allen *et al.*, 1991b).

Em face das características hidrofílicas do PEG, a incorporação em lipossomas de 5-7 mol% de PEG-DSPE determina um certo grau de desidratação da região do grupo polar do lípido membranar em favor do próprio PEG. Desta forma, há uma diminuição do tamanho molecular do grupo polar e o conseqüente aumento do empacamento lateral entre as cadeias de ácidos gordos. Este efeito resulta, globalmente, num aumento da estabilidade

termodinâmica dos lipossomas (Tirosh *et al.*, 1998). Acima desta concentração, ocorre a solubilização dos lipossomas com a conseqüente formação de micelas mistas (Allen *et al.*, 1991b; Tirosh *et al.*, 1998). A formação destas micelas pode, no entanto, ser significativamente reduzida através da incorporação na bicamada de uma quantidade de colesterol superior a 30 mol%, à qual é subjacente uma diminuição da interacção das cadeias de PEG entre si (Bedu-Addo *et al.*, 1996). No caso específico de lipossomas constituídos por distearoilfosfatidilcolina e PEG-DSPE, demonstrou-se também que a presença de colesterol aumenta o tempo de residência sanguínea daqueles, devido a uma diminuição da acumulação nas células do sistema monocítico fagocitário e a um aumento da estabilidade física dos lipossomas (Maruyama *et al.*, 1992).

Uma das principais razões para os tempos de circulação prolongados de lipossomas com PEG assenta na estabilização estérea promovida por este polímero. As longas cadeias hidrofílicas, flexíveis e hidratadas de PEG₂₀₀₀ com cerca de 5 a 6,5 nm de comprimento (Needham *et al.*, 1992; Woodle *et al.*, 1992a; Hristova *et al.*, 1995), constituem um *escudo* hidrofílico eficaz. Diminuem de forma significativa a rapidez e a extensão de interacções electrostáticas ou hidrofóbicas entre a superfície da membrana lipossómica e os vários componentes do sangue que possam mediar a sua eliminação e/ou desintegração (Lasic *et al.*, 1991; Needham *et al.*, 1992; Woodle *et al.*, 1992a; Torchilin *et al.*, 1994).

A observação de que outros compostos derivatizados com 1,2-distearoilfosfatidiletanolamina, como as poli(oxazolinias) (Zalipsky *et al.*, 1996b) ou poliamidas (Ansell *et al.*, 1999), podem conferir aos lipossomas tempos de circulação sanguínea prolongados, reforçam a ideia de que a acção do PEG se deve a um efeito físico e não químico.

Tal como referido na secção anterior a propósito do monosialogangliósido, a incorporação de PEG em lipossomas determina que a variação dos níveis sanguíneos destes em função do tempo seja linear à escala logarítmica (dominada pela fase de eliminação β) e independente da dose (Allen e Hansen, 1991; Papahadjopoulos *et al.*, 1991; Woodle *et al.*, 1992b; Gabizon *et al.*, 1994). Para doses compreendidas entre 0,1 e 5 μ mol de

fosfolípido/ratinho, os tempos de semi-vida de eliminação sanguínea dos lipossomas com PEG variam entre 19 e 21 h, enquanto que os dos lipossomas convencionais, para o mesmo intervalo de doses, apresentam valores compreendidos entre 2 e 11 h (Allen e Hansen, 1991). Este tipo de comportamento mais reprodutível representa uma clara vantagem relativamente aos lipossomas convencionais, uma vez que facilita o cálculo das doses clínicas para obtenção de um determinado efeito terapêutico (Allen, 1994). Em adição, os lipossomas com PEG são desprovidos do perigo de saturação do sistema monocítico fagocitário (Allen, 1988), dentro do intervalo de doses terapêuticas (em ratinhos, a saturação ocorrerá para doses superiores a 10 μmol de fosfolípido/ratinho ou 400 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ de peso corporal de ratinho) (Allen e Hansen, 1991).

A incorporação de PEG em lipossomas confere-lhes uma versatilidade em termos de composição, uma vez que, permite obter lipossomas com tempos de circulação sanguínea prolongados, independentemente, da temperatura de transição do lípido principal, fosfatidilcolina de ovo *versus* distearoilfosfatidilcolina, (Allen *et al.*, 1991b; Lasic *et al.*, 1991; Woodle *et al.*, 1992b), da presença de colesterol (Woodle *et al.*, 1992b) e do diâmetro médio (numa gama de valores entre 100 e 200 nm) (Allen *et al.*, 1991b; Woodle *et al.*, 1992b; Litzinger *et al.*, 1994). Fora do referido intervalo de valores de tamanhos, aumenta a velocidade de eliminação sanguínea dos lipossomas. Para diâmetros médios inferiores a 70-90 nm aumenta a acumulação ao nível dos hepatócitos, devido à capacidade dos lipossomas para atravessarem as fenestrações hepáticas (Allen *et al.*, 1991b; Litzinger *et al.*, 1994). Para diâmetros médios superiores a 250-300 nm, os lipossomas são preferencialmente filtrados ao nível do baço (Woodle *et al.*, 1992b; Litzinger *et al.*, 1994). De referir, no entanto, que a formulação da matriz lipídica com dioleilfosfatidiletanolamina, em lipossomas com PEG e com diâmetros médios inferiores a 200 nm, determina, surpreendentemente, o aumento da acumulação no fígado ou no baço, consoante se utiliza, respectivamente, PEG₂₀₀₀ ou PEG₅₀₀₀ (Litzinger e Huang, 1992). Relativamente à incorporação de lípidos carregados negativamente, como é o caso do fosfatidilglicerol ou do sulfato de colesterol, a presença de PEG permite que esta se dê sem afectar os tempos de circulação sanguínea dos lipossomas

(Woodle *et al.*, 1992b). Na presença de fosfatidilserina (10 mol%), há que salientar que a incorporação de PEG em lipossomas, em quantidades tão elevadas quanto 10 mol%, não é capaz de inibir a acumulação daqueles pelos macrófagos do fígado e do baço (Allen *et al.*, 1991b), tal como observado para o monosialogangliósido (Allen *et al.*, 1988).

No que diz respeito à via de administração, os lipossomas com PEG, após administração intraperitoneal ou subcutânea, e uma vez no compartimento vascular, apresentam um tempo de semi-vida da ordem das 20 h e um padrão de distribuição semelhante ao dos lipossomas administrados por via intravenosa (Allen *et al.*, 1991b; Allen *et al.*, 1993). Este facto é consentâneo com a hipótese de que os lipossomas, nestas circunstâncias, permanecem intactos quando atingem a circulação (Allen *et al.*, 1993). A velocidade de absorção para o sangue depende do local de administração e do diâmetro médio dos lipossomas. Os lipossomas com PEG e com um diâmetro médio aproximado de 90 nm, são completamente absorvidos a partir da cavidade peritoneal para o sangue, com um tempo de semi-vida de cerca de 1 h (Allen *et al.*, 1993). No caso de uma administração subcutânea, os lipossomas migram através dos vasos linfáticos (Oussoren e Storm, 1997; Oussoren *et al.*, 1998) e apenas 30-40% dos lipossomas com diâmetro médio entre 80 e 90 nm são absorvidos para a corrente sanguínea, com um tempo de semi-vida de cerca de 11 h (Allen *et al.*, 1993). Esta absorção é também favorecida pela administração de doses elevadas de lipossomas, pela presença de colesterol e para tamanhos inferiores a 110-120 nm (Allen *et al.*, 1993). De referir que, no caso da administração subcutânea de lipossomas convencionais, a extensão da absorção vascular apresenta o mesmo tipo de dependência da dose e do tamanho, embora seja muito mais reduzida do que para os lipossomas com PEG (Allen *et al.*, 1993).

Até ao momento, o exemplo de maior sucesso da utilização de lipossomas com PEG em terapia antitumoral é dado pela vectorização de doxorubicina em lipossomas, sistema que é objecto de estudo no presente trabalho e que a seguir se passa a descrever.

1.3.3. Lipossomas de doxorubicina estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol)

A doxorubicina (Figura 1.12.) é um antibiótico antitumoral da família das antraciclina que pode ser isolado a partir de culturas de *Streptomyces peucetius* ou preparado por síntese química a partir da daunorrubicina (Vigevani e Williamson, 1980).

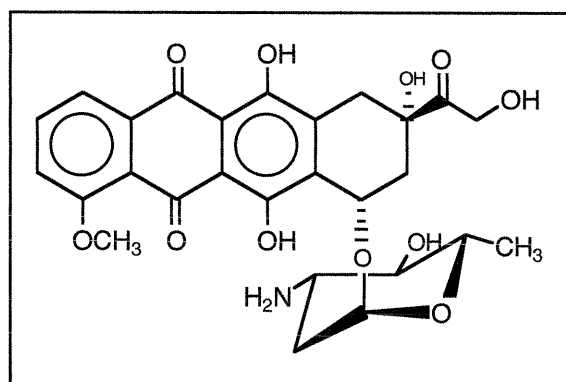


Figura 1.12. - Estrutura química da doxorubicina (adaptado de Drummond *et al.*, 1999).

Na forma livre, o carácter anfílico da doxorubicina permite-lhe atravessar a membrana celular por simples difusão passiva (Regev e Eytan, 1997). Para além de danificar macromoléculas e lípidos membranares (na sequência da formação de radicais livres), o seu efeito citotóxico resulta, fundamentalmente, da sua acção sobre o processo de replicação do DNA (fase S do ciclo celular; Figura 1.13.) (Azevedo, 1986). A este nível, inibe a acção da topoisomerase II e de helicases nucleares, e intercala-se entre os pares de bases de DNA (Hande, 1998).

A doxorubicina livre, quando administrada por via intravenosa, é rapidamente eliminada da corrente sanguínea de uma forma bifásica, apresentando em humanos, tempos de semi-vida sanguínea α e β , respectivamente, de 0,07 e de 9 a 10 h. O seu carácter anfílico determina que, uma vez no sangue, se distribua em grande extensão para outros tecidos. Assim se justifica a sua elevada velocidade de eliminação sanguínea (25 L/h) e o seu

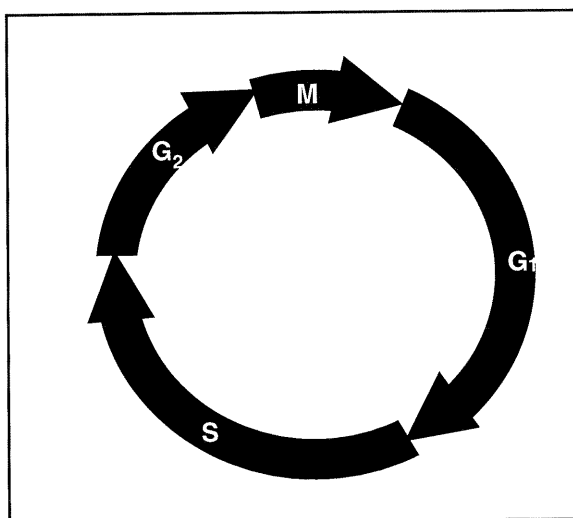


Figura 1.13. - Diagrama do ciclo celular. No ciclo celular de células eucarióticas, a replicação de DNA ocorre exclusivamente durante a fase S. A fase S é precedida e seguida, respectivamente, pelas fases G₁ e G₂, em que, apesar de não haver produção de DNA, poderá ocorrer a sua reparação. Durante o conjunto destas três fases existe crescimento celular e uma produção contínua de outras macromoléculas celulares, como o ácido ribonucleico, proteínas e membranas. A divisão celular (mitose) dá-se na fase M, em que cópias idênticas do DNA celular são distribuídas de igual forma pelas duas novas células. O efeito citotóxico da doxorubicina resulta fundamentalmente da sua acção sobre o processo de replicação do DNA (fase S), através da inibição da acção da topoisomerase II e de helicases nucleares, e da intercalação ao nível dos pares de bases de DNA (adaptado de Kastan, 1997).

elevado volume de distribuição (365 L), para uma dose de 50 mg de doxorubicina/m² (Gabizon *et al.*, 1994).

A encapsulação da doxorubicina em lipossomas constituídos por fosfatidilcolina hidrogenada de soja:colesterol:PEG₁₉₀₀-DSPE:α-tocoferol nas razões molares 56,2:38,3:5,3:0,2 (formulação que na Europa tem a designação comercial de Caelyx^{®7}), altera por completo o seu perfil farmacocinético. Para uma dose de 50 mg de doxorubicina/m², observou-se um aumento significativo dos tempos de semi-vida de eliminação α e β (respectivamente, para 2 e 46 h) tal como dos tempos de residência médios (66 h para a doxorubicina lipossómica *versus* 12 h para a doxorubicina livre). Adicionalmente, registou-se também uma diminuição acentuada da velocidade de eliminação (0,1 L/h) e do volume de distribuição (6 L) (Gabizon *et al.*, 1994). Este último dado é aliás indicador de que o fármaco lipossómico se encontra predominantemente confinado ao compartimento vascular. Há a acrescentar ainda que, com esta formulação e decorridas 168

⁷ Marca registada da Alza Corporation (Mountain View, CA).

h, a quase totalidade da doxorubicina se encontra associada aos lipossomas (Gabizon *et al.*, 1994). Este tipo de padrão de comportamento entre a doxorubicina lipossômica e a doxorubicina livre foi também observado em cães, se bem que o valor absoluto do tempo de semi-vida β de 29 h seja inferior ao referenciado para os humanos (Gabizon *et al.*, 1993). Este conjunto de dados revela de forma inequívoca que a biodistribuição da doxorubicina lipossômica passa a ser função das características do vector que a veicula, constituindo um excelente exemplo para ilustrar o conceito de vectorização descrito na secção 1.2.1..

Como referido anteriormente (secção 1.3.2.2.), a versatilidade conferida à formulação de lipossomas que decorre da incorporação de PEG-DSPE permite que os seus tempos de circulação sanguínea sejam independentes da temperatura de transição de fase do fosfolípido principal. O mesmo não se passa, no entanto, quanto à capacidade dos lipossomas reterem a doxorubicina encapsulada. A substituição de um fosfolípido como a fosfatidilcolina hidrogenada de soja por outros com menor temperatura de transição de fase, como a dipalmitoilfosfatidilcolina ou a fosfatidilcolina de ovo, determina, respectivamente, diminuições das concentrações sanguíneas de doxorubicina de cerca de 2 e 50 vezes. A razão desta diminuição resulta, sequencialmente, de um aumento acentuado da permeabilidade da bicamada, aumento da velocidade de libertação da doxorubicina a partir dos lipossomas circulantes e posterior redistribuição do fármaco libertado para outros tecidos (Gabizon *et al.*, 1993).

Como seria de esperar, a alteração do padrão de biodistribuição da doxorubicina lipossômica relativamente à sua forma livre, leva a uma alteração acentuada do seu perfil de toxicidade. Diminui, por exemplo, o potencial de cardiotoxicidade, náusea, vômito e alopecia, associado ao fármaco livre, aumentando, porém, os riscos de eritrodisestesia palmo-plantar, estomatite ou leucopenia que, todavia, podem ser controlados por diminuição das doses ou aumento do intervalo entre a administração das mesmas (Alberts e Garcia, 1997; Levitt, 1999).

Desta forma, os perfis farmacocinéticos favoráveis da doxorubicina lipossômica com PEG relativamente à sua forma livre, a par da sua estabilidade *in vivo* e da capacidade

dos lipossomas para extravasar do compartimento vascular para o tumor (de forma aliás mais eficaz que os lipossomas convencionais; Wu *et al.*, 1993), contribuem para aumentar a acumulação tumoral e a eficácia terapêutica da doxorubicina lipossômica relativamente à doxorubicina livre. Estas características constituem a base do sucesso do conjunto de estudos terapêuticos realizados nas fases pré-clínica e clínica (revistos recentemente por Harrington *et al.*, 2000a; Harrington *et al.*, 2000b), e que justificam a utilização comercial dos lipossomas de doxorubicina (Caelyx®). Este produto está aprovado no tratamento do sarcoma de Kaposi, em doentes com o síndrome da imunodeficiência adquirida (Bergin *et al.*, 1995; Lasic, 1996; Northfelt *et al.*, 1996; Northfelt *et al.*, 1998). A aprovação estende-se também à sua utilização como quimioterapia de segunda linha contra o cancro do ovário em fase avançada, patologia para a qual o tratamento prévio com complexos de platina se revelou ineficaz (Muggia *et al.*, 1997; Gordon *et al.*, 2000). A avaliação clínica não se cinge apenas a estes dois tipos de tumores. De facto, em pacientes com cancro da mama avançado submetidos ao tratamento com Caelyx® registou-se uma resposta ao tratamento de 31% (Ranson *et al.*, 1997). Em doentes com cancro do pulmão (adenocarcinoma e epidermóide) e do pescoço e da cabeça, em combinação com radioterapia, as respostas ao tratamento foram, respectivamente, de 21 e 75% (Koukourakis *et al.*, 1999). Estes resultados promissores, poderão perspectivar uma possível utilização de Caelyx® no tratamento deste tipo de tumores.

A doxorubicina é um dos muitos exemplos de substâncias cuja acção se exerce a um nível intracelular. Com o intuito de aumentar a eficácia de acção destes fármacos, torna-se importante o desenvolvimento de estratégias que proporcionem a cedência intracelular daqueles. Neste contexto, a vectorização de lipossomas mediada por ligandos encerra um enorme potencial.

1.4. VECTORIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS MEDIADA POR LIGANDOS

1.4.1. Considerações gerais

A endocitose mediada por receptores é um processo comum a todas as células eucariotas (com exceção dos eritrócitos em fase avançada de maturação) e que constitui uma forma eficaz das células captarem e processarem nutrientes. A endocitose é despoletada pela ligação de um determinado ligando a receptores específicos existentes à superfície das células. Desta ligação, resulta a invaginação de uma dada região da membrana citoplasmática (revestida por uma proteína denominada clatrina) e a consequente internalização celular do sistema *ligando + receptor*. Na sequência da perda do revestimento de clatrina e da acidificação do meio intravesicular forma-se o endossoma. A diminuição do pH determina a dissociação do ligando ao receptor, o qual pode ser regenerado (dependendo do tipo de receptor) para a superfície da membrana celular, enquanto que o ligando é processado intracelularmente (Ríhová, 1998). Com base nestes princípios, a vectorização de lipossomas mediada por ligandos acoplados à superfície daqueles (Figura 1.1.) tem por objectivo promover especificamente a cedência intracelular de fármacos ao nível de uma determinada população celular, na sequência de um processo de endocitose dos lipossomas mediado por receptores.

Esta estratégia mais não é do que uma forma de dotar os lipossomas (vector não viral) de uma capacidade análoga à de vírus, como o da imunodeficiência humana, que infectam determinado tipo de células. No caso do vírus da imunodeficiência humana, o processo de infecção inicia-se com a ligação específica da glicoproteína gp 120, existente à sua superfície, aos receptores CD4 presentes à superfície das células do sistema imunitário, e em particular, linfócitos e macrófagos. Daqui resulta um processo de fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática daquelas células, seguido da libertação intracelular do genoma viral (Simões, 1998).

Em face do exposto, a concepção da vectorização de lipossomas para células tumorais, implica a escolha de um ligando que tenha elevada afinidade para um determinado

receptor. Este, tem que ser expresso de forma estável e específica à superfície das células tumorais (ou, pelo menos, deve ser expresso preferencialmente à superfície das células tumorais relativamente às células sãs) e tem que ser susceptível de internalização mediante a ligação do ligando específico.

É pois importante que a estratégia de acoplamento do ligando resulte numa ligação estável aos lipossomas, e num local que não comprometa a acessibilidade do ligando ao receptor. É igualmente crucial que, na sequência do acoplamento, o ligando permaneça quimicamente intacto de forma a que não seja comprometida a sua ligação ao receptor e que, na sequência desta ligação, seja despoletada a internalização do receptor juntamente com o lipossoma (a ele ligado) e respectivo conteúdo.

De um ponto de vista biofarmacêutico, é importante que o acoplamento do ligando não comprometa as propriedades farmacocinéticas originais dos lipossomas. Em adição, este processo não deve causar alterações substanciais no diâmetro médio final dos lipossomas nem, naturalmente, promover a libertação prematura do material encapsulado.

1.4.2. Métodos de acoplamento de ligandos a lipossomas

No âmbito da utilização de lipossomas em terapia antitumoral foi já realçada na secção 1.3.2.2., a importância da incorporação de PEG na manutenção dos lipossomas na corrente sanguínea. Neste contexto, o acoplamento de ligandos a lipossomas com PEG pode efectuar-se covalentemente, ou não, à superfície da bicamada (em particular, ao nível dos grupos polares dos fosfolípidos, devidamente derivatizados com grupos reactivos; revisto por Allen *et al.*, 1994; Zalipsky *et al.*, 1996a), ou covalentemente na extremidade das cadeias de PEG.

O acoplamento de ligandos à superfície da bicamada fosfolipídica apresenta dois inconvenientes fundamentais: por um lado, a dificuldade de acesso dos ligandos aos grupos reactivos existentes ao nível da superfície da bicamada; por outro lado, a dificuldade de acesso dos ligandos acoplados aos respectivos receptores celulares, em virtude da presença das longas cadeias hidrofílicas de PEG no lipossoma (Klibanov *et al.*, 1991; Blume *et al.*,

1993; Maruyama *et al.*, 1995). Assim, nesta secção, e em face do tipo de estratégias de acoplamento utilizadas neste trabalho, dar-se-á especial ênfase aos métodos de acoplamento de ligandos que têm lugar na extremidade das cadeias hidrofílicas de PEG (Figura 1.1.).

Existem fundamentalmente quatro métodos de acoplamento diferentes (Figura 1.14.), sendo comum a todos eles a existência de um grupo na extremidade das cadeias de PEG que, ou é o precursor de um outro grupo reactivo ou irá reagir por si directamente, e em determinadas condições de pH, com um grupo reactivo preexistente ou que foi incorporado no ligando, num passo prévio de activação.

O método que utiliza hidrazida-poli(etilenoglicol)-distearoilfosfatidiletanolamina (HZ-PEG-DSPE) incorporado em lipossomas envolve a reacção, a pH 5,5, dos grupos hidrazida com grupos aldeído do ligando. Estes obtêm-se por oxidação de grupos carboidratos do ligando com periodato de sódio (Figura 1.14.A) (Hansen *et al.*, 1995). Este método foi utilizado no acoplamento do anticorpo monoclonal anti-CD19 a lipossomas contendo doxorrubicina, para posterior vectorização contra células de linfoma (Lopes de Menezes *et al.*, 1998) e contra células de mieloma múltiplo (Lopes de Menezes *et al.*, 2000).

No caso da utilização do N-(3'-(piridilditio)propionoil)amino-poli(etilenoglicol)-distearoilfosfatidiletanolamina (PDP-PEG-DSPE) incorporado na membrana lipossómica, o acoplamento envolve a formação de uma ligação tioéter a pH 6,5 - 6,7, entre os lipossomas e o respectivo ligando (Figura 1.14.B). Para o efeito, reduzem-se os grupos dissulfeto com ditioneitol, de que resulta a formação de grupos tiol reactivos na extremidade do PEG. Adicionalmente, introduzem-se grupos maleiamida no ligando através da sua reacção, por exemplo, com o éster hidroxisuccinimida do ácido ϵ -maleiamidocapróico (Allen *et al.*, 1995b). A título de exemplo, refira-se a utilização deste método para acoplar o anticorpo monoclonal anti-MUC-1 a lipossomas de doxorrubicina, testados contra células de cancro da mama (Moase *et al.*, 2001). Refira-se também a utilização deste método de acoplamento no trabalho descrito nos capítulos 2, 3 e 5 desta dissertação.

A utilização de maleiamido-poli(etilenoglicol)-distearoilfosfatidiletanolamina (MAL-PEG-DSPE) na membrana dos lipossomas envolve também a reacção entre um grupo maleimida e um grupo tiol (Figura 1.14.C). Este método requer apenas a tiolação do

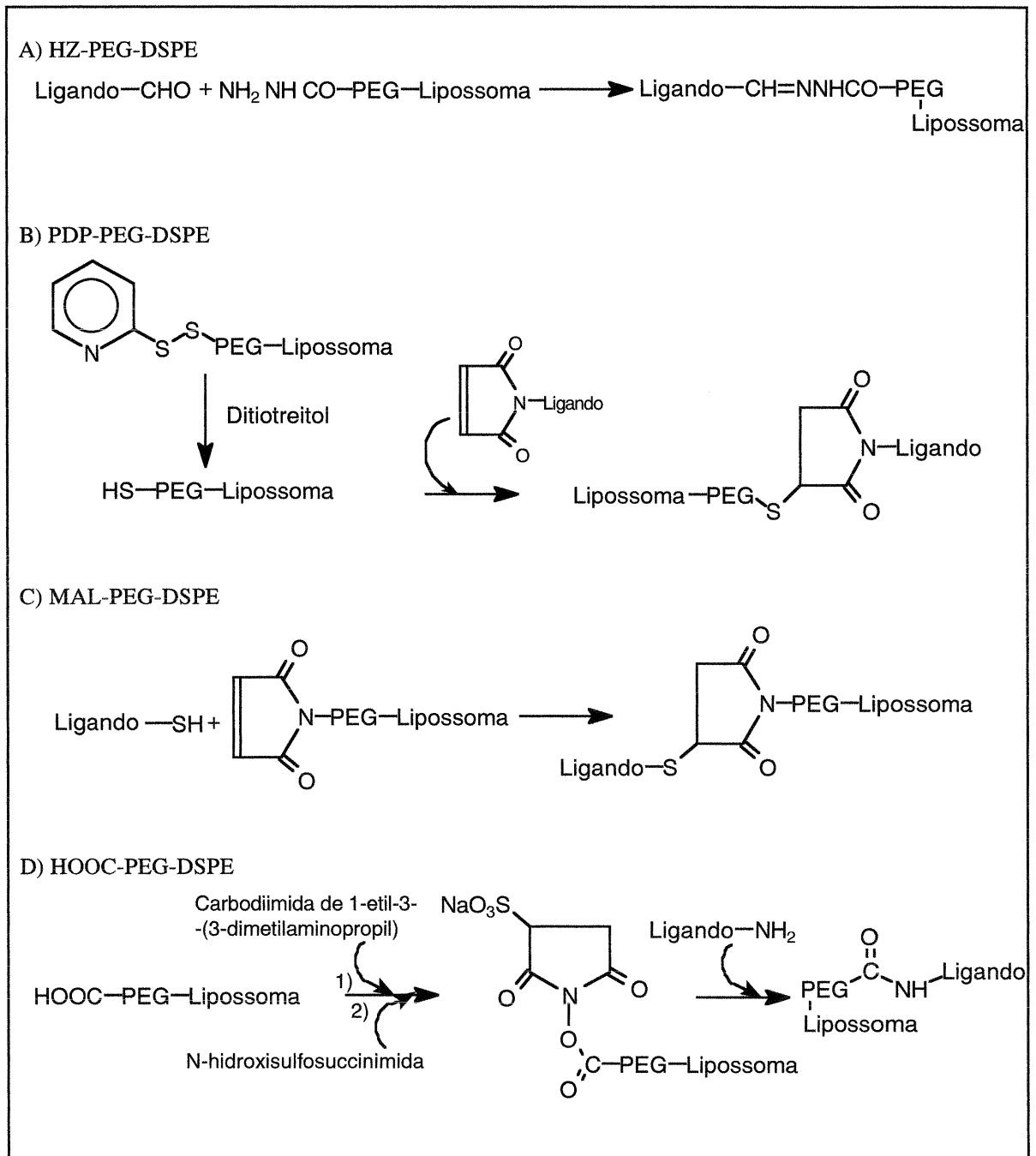


Figura 1.14. - Representação dos métodos de acoplamento mais comuns de ligandos a lipossomas, através da extremidade reactiva das cadeias de PEG incorporado à superfície dos lipossomas. Consultar o texto para mais detalhes (adaptado de Hansen *et al.*, 1995; e de Hermanson, 1996b).

ligando com 2-iminotiolano, o qual reage especificamente com aminas primárias a pH básico (Hermanson, 1996a). No caso dos ligandos serem fragmentos de anticorpos monoclonais ou proteínas com cisteína na sua constituição, a presença de grupos tiol é inerente à constituição destas moléculas, pelo que, o passo de activação do ligando é omitido, o que simplifica ainda mais o processo de acoplamento. Este método de acoplamento foi já utilizado para vectorizar lipossomas de doxorrubicina contra células de cancro da mama (Kirpotin *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997), utilizando como ligandos fragmentos do anticorpo monoclonal anti-glicoproteína p185^{HER2}. Esta metodologia de acoplamento esteve também na base da vectorização de lipossomas com oligonucleótidos *antisense* (contra-sentido) contra células de neuroblastoma, através da utilização do anticorpo monoclonal anti-GD2 (Pagnan *et al.*, 2000). Destaque-se, igualmente, a utilização deste método de acoplamento no trabalho descrito nos capítulos 4 e 5 desta dissertação.

Finalmente, existe um outro método de acoplamento que envolve a utilização do distearoil-N-(3-carboxipropionil poli(etilenoglicol) succinil) fosfatidiletanolamina (HOOC-PEG-DSPE). Este método consiste na activação prévia do grupo carboxílico à superfície do PEG com formação de um grupo activo intermediário, que posteriormente reage com as aminas primárias do respectivo ligando, a um valor de pH entre 5,5 e 6 (Figura 1.14.D) (Maruyama *et al.*, 1995; Hermanson, 1996c). Como exemplo da utilização deste método, refira-se a vectorização de lipossomas com o anticorpo monoclonal 273-34 A (anti-trombomodulina) ou com a transferrina, respectivamente, para células endoteliais dos capilares pulmonares de ratinhos (Maruyama *et al.*, 1995) ou para células de cancro de cólon de rato (Ishida *et al.*, 2001).

1.4.3. Interação entre lipossomas vectorizados e células tumorais

1.4.3.1. Ligação de lipossomas a receptores celulares

O primeiro passo da interacção entre os lipossomas vectorizados com ligandos e as células tumorais, independentemente das células tumorais se organizarem sob a forma de um

tumor sólido ou se apresentarem de forma individualizada no compartimento vascular, consiste na ligação daqueles a receptores específicos existentes à superfície das células tumorais. Nestas circunstâncias, e considerando o caso de um fármaco confinado ao núcleo aquoso dos lipossomas, é desde logo de admitir a libertação extracelular de algum fármaco a partir dos lipossomas existentes à superfície das células tumorais (Mastrobattista *et al.*, 1999a). A extensão desta libertação dependerá, entre outros factores, da velocidade de difusão do fármaco para o meio extracelular e da velocidade de internalização dos lipossomas. Particularmente no caso de tumores sólidos, o fármaco libertado nestas condições poderá difundir-se no seio da massa tumoral, exercendo assim um efeito tóxico que se pode estender a outras células tumorais que não tenham interagido directamente com os lipossomas vectorizados. Este fenómeno pode também ser o resultado da libertação (de forma activa ou passiva) de um fármaco a partir do meio intracelular (Marjan e Allen, 1996; Mastrobattista *et al.*, 1999a).

A libertação de um fármaco encapsulado em lipossomas para o meio extracelular constitui o principal mecanismo pela qual é desencadeada a citotoxicidade de lipossomas vectorizados de doxorubicina, nos casos em que a ligação a um determinado receptor específico não é seguida pela internalização do sistema lipossómico. Este mecanismo de citotoxicidade é, aliás, semelhante ao dos lipossomas não vectorizados contendo doxorubicina (Horowitz *et al.*, 1992; Lopes de Menezes *et al.*, 1999). Esta situação é ilustrada pela vectorização de lipossomas de doxorubicina com PEG através do anticorpo monoclonal N-12A5, o qual tem grande afinidade para a glicoproteína membranar p185^{HER2} (Goren *et al.*, 1996). Apesar da ligação acentuada destes lipossomas à linha celular humana de carcinoma gástrico N-87, a ausência de internalização celular justifica a ausência de qualquer diferença de citotoxicidade e de acção terapêutica para com os mesmos lipossomas, não vectorizados (Goren *et al.*, 1996).

É de salientar, todavia, que nestas circunstâncias a ausência de internalização celular dos lipossomas vectorizados não significa necessariamente que não possa haver uma melhoria da actividade antiproliferativa do fármaco por eles veiculado, relativamente ao

mesmo fármaco transportado em lipossomas não vectorizados. Lipossomas contendo o derivado palmitoil da 5-fluoro-2'-deoxiuridina (pró-droga lipofílica) e vectorizados com o anticorpo monoclonal CC52, associam-se especificamente e em maior extensão com a linha celular de cancro do cólon CC531 do que os lipossomas sem anticorpo, sem, no entanto, serem internalizados (Koning *et al.*, 1999b). Este facto não impede que, em incubações de 24 a 72 h, a actividade antiproliferativa do fármaco encapsulado em lipossomas com anticorpo seja significativamente mais elevada do que a do mesmo fármaco encapsulado em lipossomas sem anticorpo (Koning *et al.*, 1999a). Segundo estes autores, a elevada afinidade da interacção entre os lipossomas com anticorpo e as células tumorais, permite que o derivado palmitoil da 5-fluoro-2'-deoxiuridina seja transferido da bicamada dos lipossomas para a membrana plasmática, onde é internalizado por endocitose e pinocitose. Segue-se a hidrólise ao nível dos lisossomas, difusão para o citoplasma e depois para o núcleo, onde exerce a sua acção citotóxica (Koning *et al.*, 1999b). Este mecanismo de transferência parece também contribuir para justificar o sucesso resultante da encapsulação do mesmo fármaco em lipossomas vectorizados com o anticorpo monoclonal anti-trombomodulina, no tratamento de metástases pulmonares (Mori *et al.*, 1995).

1.4.3.2. Internalização celular de lipossomas mediada por receptores

A internalização celular (endocitose) mediada por receptores é o evento mais frequente que decorre da ligação de lipossomas vectorizados com ligandos a um receptor específico. Nestas condições, a acumulação intracelular dos lipossomas depende da densidade de expressão do receptor *alvo*, mas também da capacidade deste em ser funcionalmente activado (internalizado) na sequência da sua ligação ao ligando acoplado aos lipossomas (Kirpotin *et al.*, 1997; Montaldo *et al.*, 1999a). Uma vez no interior da célula, os lipossomas juntamente com o fármaco encapsulado seguem a via endocítica, sendo crítica para o sucesso desta estratégia a capacidade do fármaco em resistir à acidificação do meio e/ou à acção das enzimas lisossómicas, antes de alcançar o citoplasma e/ou o núcleo (Allen e Moase, 1996).

Esta via de cedência de fármacos tem-se revelado uma forma eficaz de melhorar a acumulação intracelular e, por conseguinte, a actividade citotóxica (e/ou terapêutica) de diversos fármacos, relativamente às formulações lipossómicas dos mesmos fármacos que não sejam vectorizadas. A título de exemplo, refira-se o caso dos lipossomas de doxorrubicina vectorizados, quer pelo anticorpo monoclonal anti-CD19 contra células de linfoma (Lopes de Menezes *et al.*, 1998; Lopes de Menezes *et al.*, 1999) ou células de mieloma múltiplo (Lopes de Menezes *et al.*, 2000), quer pelo fragmento do anticorpo monoclonal humanizado anti-glicoproteína p185^{HER2} contra células de cancro da mama (Park *et al.*, 1995; Kirpotin *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997). A utilidade desta estratégia foi também já demonstrada com outros fármacos como a fenretinida contra melanoma (Montaldo *et al.*, 1999a; Pagnan *et al.*, 1999) ou a benzilguanidina contra melanoma e neuroblastoma (Montaldo *et al.*, 1999b), em que o ligando de vectorização utilizado foi o anticorpo monoclonal contra o disialogangliósido GD2. No caso particular da benzilguanidina, o acesso deste fármaco ao meio intracelular é mediado especificamente pelo transportador membranar da noradrenalina, o qual não é expresso pelas células de melanoma. Nestas condições, é de destacar que a encapsulação daquele fármaco em lipossomas vectorizados, com a correspondente internalização celular mediada pelo receptor GD2, permite que a acumulação intracelular da benzilguanidina seja independente da presença do transportador da noradrenalina e significativamente superior à do fármaco livre (Montaldo *et al.*, 1999b). Com este mesmo anticorpo monoclonal, foi possível vectorizar lipossomas contendo um oligonucleótido *antisense* (contra-sentido) anti-*c-myb* para células humanas de neuroblastoma, com melhorias significativas da citotoxicidade do composto encapsulado, relativamente a qualquer dos controlos testados (Pagnan *et al.*, 2000).

É de referir que existem outros receptores que têm sido usados com sucesso como mediadores da internalização celular de lipossomas. A título de exemplo, refira-se, a E-selectina (Spragg *et al.*, 1997) e a molécula de adesão intercelular 1 (Mastrobattista *et al.*, 1999b), as quais são glicoproteínas membranares superficiais cuja expressão está aumentada em situações de inflamação; o receptor da transferrina (Matthay *et al.*, 1989; Cheng, 1996;

Sarti *et al.*, 1996; Huwylar *et al.*, 1997; Eavarone *et al.*, 2000; Ishida *et al.*, 2001), por intermédio do qual se podem também vectorizar lipossomas para o cérebro mediante administração intravenosa (Huwylar *et al.*, 1996; Shi e Pardridge, 2000; Shi *et al.*, 2001); e o receptor do ácido fólico (Lee e Low, 1994; Lee e Low, 1995; Lee e Huang, 1996; Gabizon *et al.*, 1999). É de realçar que, em experiências realizadas com lipossomas de doxorubicina vectorizados com o ácido fólico, esta via de cedência intracelular (bem como a actividade citotóxica que daqui decorre) demonstrou ser insensível ao mecanismo de resistência a citostáticos mediados pela glicoproteína P, comumente desenvolvido pelas células tumorais (Goren *et al.*, 2000).

1.4.3.3. Fusão de lipossomas com a membrana plasmática

A fusão de lipossomas vectorizados com a membrana plasmática das células tumorais tem por objectivo a cedência intracelular do conteúdo dos lipossomas directamente para o citoplasma das células, evitando, desta forma, a via endocítica. Esta pode ser uma vantagem importante quando se veiculam substâncias que sejam sensíveis à acidificação e à acção de enzimas lisossómicas. De um ponto de vista da interacção lipossoma-célula outras vantagens podem ser realçadas: por um lado, não há necessidade de haver internalização celular dos lipossomas, pelo que não é necessária a escolha de um receptor *alvo* que seja susceptível de ser endocitado; por outro lado, para que o processo de fusão ocorra, não há limitações no que diz respeito ao tamanho dos lipossomas (Mastrobattista *et al.*, 1999a). De referir que a endocitose de lipossomas mediada por receptores é limitada a lipossomas com um diâmetro médio inferior, aproximadamente, a 150 nm (Forssen e Willis, 1998).

Esta via de cedência intracelular tem sido pouco explorada, todavia, a demonstração *in vitro* deste conceito foi já levada à prática. Foi possível observar que lipossomas contendo uma proteína fusogénica ao nível da membrana, e vectorizados com um anticorpo monoclonal para um receptor membranar específico, cedem o seu conteúdo, predominantemente, por fusão com a membrana plasmática (Compagnon *et al.*, 1992). A aplicabilidade futura desta estratégia exige estudos mais aprofundados, nomeadamente, no

que diz respeito à sua especificidade de acção.

1.4.4. Vectorização *in vivo* de lipossomas

1.4.4.1. Vectorização para tumores no compartimento vascular

Tumores como o linfoma, o mieloma múltiplo ou a leucemia são doenças confinadas, predominantemente, ao compartimento vascular. Nestas condições, as células tumorais circulantes, dada a sua acessibilidade, podem constituir um excelente *alvo* para as estratégias terapêuticas que envolvem a administração, por via intravenosa, de lipossomas vectorizados com ligandos.

Lopes de Menezes *et al.* (1998), testaram a actividade terapêutica de lipossomas com PEG de doxorrubicina, vectorizados com o anticorpo monoclonal anti-CD19, em ratinhos imunodeprimidos e inoculados, por via intravenosa, com a linha celular Namalwa (células de linfoma humano e que expressam o receptor CD19, CD19+). A administração intravenosa de uma única dose destes lipossomas, resultou em aumentos significativos (relativamente a amostras controlo) da esperança de vida dos animais (entre 55 e 95%), bem como na obtenção de sobreviventes a longo termo (4 em 9, com mais de 150 dias), dependendo do tempo que mediou entre a injeção das células e o início do tratamento (1 ou 24 h) e do número de células com que os animais foram inoculados. De registar que, os tratamentos com doses múltiplas (realizados nos dias 1, 8 e 15, após inoculação com as células tumorais) resultou apenas num pequeno aumento da esperança de vida dos animais, relativamente ao tratamento com uma única dose. Este resultado sugere uma possível diminuição da acessibilidade dos lipossomas vectorizados com anticorpo às células tumorais, provavelmente, devido à extravasão destas para outros tecidos ou devido à formação de tumores sólidos menos acessíveis (Lopes de Menezes *et al.*, 1998).

Como referido anteriormente, o sucesso desta terapia é resultado de uma eficaz cedência intracelular da doxorrubicina (num processo de endocitose dos lipossomas mediado por receptores) quando encapsulada nos lipossomas vectorizados com o anticorpo

monoclonal anti-CD19 (Lopes de Menezes *et al.*, 1998; Lopes de Menezes *et al.*, 1999).

Maruyama *et al.* (1995) desenvolveram um sistema em que a vectorização se fez por intermédio de um anticorpo monoclonal (273-34A) com afinidade para a trombomodulina, a qual é uma proteína anticoagulante expressa de forma acentuada na superfície das células endoteliais do sistema vascular dos pulmões de ratinho. Desta forma, a vectorização é efectuada, não para um receptor superficial membranar de células tumorais, mas antes para um órgão, neste caso o pulmão.

Nestas condições, a acumulação pulmonar dos lipossomas com o anticorpo 273-34 A, 2 h após a administração, foi da ordem dos 50 a 60 % da dose injectada, em oposição aos valores da ordem de 1% da dose injectada, no caso de lipossomas sem anticorpo (Mori *et al.*, 1995). O tratamento de ratinhos com metástases pulmonares, com o derivado palmitoil da 5-fluoro-2'-deoxiuridina encapsulado em lipossomas vectorizados pelo referido anticorpo, resultou num aumento significativo no tempo de sobrevivência médio dos animais relativamente a qualquer um dos tratamentos controlo testados (Mori *et al.*, 1995). A este tipo de estratégia é inerente a vantagem óbvia da vectorização ser independente do tipo de tumor. Permanece, porém, por provar a utilidade da mesma no caso da administração de fármacos que se distribuam no núcleo aquoso dos lipossomas.

1.4.4.2. Vectorização para tumores na cavidade peritoneal

As células tumorais localizadas na cavidade peritoneal podem constituir também um *alvo* acessível para os lipossomas vectorizados. A eficácia terapêutica destas formulações nestas circunstâncias, relativamente aos lipossomas não vectorizados, foi já demonstrada com lipossomas de doxorubicina e vectorizados com um anticorpo monoclonal apropriado, quer o tratamento se efectue por via intraperitoneal (Lopes de Menezes *et al.*, 1998) ou por via intravenosa (Tseng *et al.*, 1999). No primeiro exemplo, a via de administração utilizada coloca os lipossomas em contacto directo com as células tumorais, pelo que, para o sucesso deste tratamento foi crítica a ligação específica do anticorpo ao receptor, com a consequente

endocitose dos lipossomas. No segundo, para além de cumprido este requisito, evidencia-se a importância dos lipossomas apresentarem tempos de circulação sanguínea prolongados, parâmetro que é determinante (a par do tamanho dos lipossomas) na extravasão passiva dos lipossomas para a cavidade peritoneal (Gabizon *et al.*, 1994).

É de salientar que, por muito eficaz que seja a ligação destes tipos de lipossomas aos respectivos receptores, o seu sucesso depende, entre outros factores, da estabilidade biológica das respectivas formulações lipossómicas e da internalização celular dos lipossomas vectorizados com ligandos, mediante ligação a um receptor celular específico. A eficácia terapêutica de lipossomas de doxorrubicina vectorizados com fragmentos Fab' do anticorpo monoclonal OV-TL3, que apresenta elevada afinidade para o receptor OA3, expresso em cerca de 90% dos cancros humanos do ovário, foi testada contra células de cancro humano do ovário confinadas à cavidade intraperitoneal (Vingerhoeds *et al.*, 1996). A elevada ligação destes lipossomas às células tumorais (cerca de 70% da dose injectada), mediante administração intraperitoneal, não teve, no entanto, a correspondência esperada em termos de actividade terapêutica, relativamente aos lipossomas não vectorizados. Na base deste resultado está precisamente, a ausência de internalização celular dos lipossomas vectorizados (Nässander *et al.*, 1995), e também, a libertação prematura do fármaco encapsulado em ambas as formulações, após administração (Vingerhoeds *et al.*, 1996).

1.4.4.3. Vectorização para tumores sólidos

1.4.4.3.1. Tumores pulmonares

O trabalho realizado por Ahmad *et al.* (1993) com lipossomas de doxorrubicina, vectorizados com um anticorpo monoclonal para um receptor específico existente à superfície de células de cancro de pulmão (epidermóide) de ratinho, constituiu um dos primeiros estudos que confirmou, *in vivo*, o potencial terapêutico de lipossomas vectorizados. Neste estudo, três dias depois da injeção intravenosa das células tumorais (altura em que as células estão já alojadas nos pulmões), deu-se início ao protocolo terapêutico com a administração

intravenosa de uma única dose de lipossomas de doxorrubicina (com ou sem anticorpo) ou fármaco livre. A utilização da formulação com anticorpo resultou em melhorias significativas dos tempos médios de sobrevivência dos animais, relativamente às outras amostras testadas, sendo de destacar os cerca de 40 a 80% de sobreviventes a longo termo (correspondente a 150 dias) (Ahmad *et al.*, 1993). Não é, todavia evidente se a actividade terapêutica é consequência da endocitose dos lipossomas (Ahmad e Allen, 1992). É importante realçar que, no caso de adiamento do início do tratamento em uma a três semanas, a actividade terapêutica de lipossomas com ou sem anticorpo passou a ser semelhante. Os autores atribuem esta semelhança a uma diminuição de expressão do receptor específico ou à dificuldade dos lipossomas vectorizados com o anticorpo monoclonal em penetrarem no seio da massa tumoral entretanto formada (Ahmad *et al.*, 1993).

A elevada irrigação sanguínea do pulmão, torna-o um *alvo* de excelência para a actuação de lipossomas vectorizados por ligandos. Recentemente, a administração intravenosa de lipossomas de doxorrubicina vectorizados com fragmentos de um anticorpo monoclonal com afinidade para uma integrina humana (β_1), decorridos sete dias após a inoculação de células humanas de cancro do pulmão (epidermóide e integrina β_1+), suprimiu de forma acentuada o crescimento dos nódulos tumorais primários (microscópicos). Surpreendentemente, preveniu-se também a metastização do tumor pulmonar para o fígado e para as glândulas adrenais (Sugano *et al.*, 2000). A eficácia da cedência intracelular da doxorrubicina associada a esta formulação, resultou, assim, num aumento significativo do tempo médio de sobrevivência dos animais (em cerca de 35%), relativamente às formulações controlo testadas. De referir que, com a doxorrubicina lipossómica não vectorizada, embora se tenha registado alguma supressão de crescimento dos pequenos tumores pulmonares primários, não foi de todo capaz de evitar o processo de metastização. Este estudo confirmou a ausência de diferenças acentuadas entre um esquema terapêutico de dose única e de doses múltiplas (Sugano *et al.*, 2000).

1.4.4.3.2. Metástases pulmonares

Um dos principais problemas com que se deparam os pacientes com cancro da mama reside no processo de metastização frequente que ocorre a partir do tumor primário. A prevenção desta disseminação sistémica de células tumorais pode fazer a diferença entre a vida e a morte do doente. Neste contexto, foi recentemente avaliado o potencial de utilização dos lipossomas de doxorubicina vectorizados com um anticorpo monoclonal (B27.29) com afinidade para uma mucina designada por MUC-1 (cuja expressão está aumentada em cancro da mama humano), para prevenir a formação de metástases pulmonares (Moase *et al.*, 2001). Foram utilizadas duas linhas celulares de cancro de mama de ratinho, ambas transfectadas com o gene humano que codifica a formação de MUC-1. As duas linhas celulares utilizadas correspondem a dois modelos animais diferentes: um dito pseudometastático, em que as células tumorais se alojam directamente nos pulmões, mediante administração intravenosa, não sendo, portanto, originárias de um tumor primário; e um outro, dito metastático, em que as células tumorais que crescem nos pulmões, se difundiram previamente por via sistémica a partir de um tumor primário (no caso, localizado no tecido adiposo mamário).

No modelo pseudometastático, a administração de uma única dose de doxorubicina encapsulada em lipossomas vectorizados, 24 h após a injeção das células tumorais, diminui o número de nódulos tumorais formados por pulmão, concomitantemente com o aumento significativo do tempo de sobrevivência dos animais, relativamente aos grupos controlo. Efeitos semelhantes foram obtidos com um protocolo terapêutico com doses múltiplas (Moase *et al.*, 2001). Confirma-se, assim, neste modelo o potencial da utilização de lipossomas vectorizados por ligandos em tumores localizados no pulmão.

No caso do modelo metastático, o estudo coloca mais uma vez em evidência a importância de se processar a internalização celular dos lipossomas mediante a sua ligação ao receptor específico. Na circunstância, a ausência de endocitose (ou de ocorrer numa extensão muito reduzida), determina que lipossomas, com ou sem anticorpo monoclonal, tenham efeitos terapêuticos muito semelhantes no que diz respeito ao efeito no crescimento do tumor primário e ao aparecimento de metástases pulmonares (Moase *et al.*, 2001).

1.4.4.3.3. Tumores implantados subcutaneamente

A utilização de tumores sólidos implantados subcutaneamente tem por objectivo avaliar a eficácia de determinada estratégia terapêutica num estado mais avançado de desenvolvimento da doença. Noutros casos, a utilização deste tipo de modelo animal decorre da impossibilidade de fazer crescer determinado tipo de células tumorais num órgão específico. Este tem constituído um campo de aplicação menos favorável para os lipossomas vectorizados com ligandos, em particular com anticorpos monoclonais. Na realidade, a utilização de anticorpos monoclonais como ligandos pode constituir, em si, uma limitação. Estas moléculas são, por exemplo, susceptíveis de despoletar reacções imunogénicas mediada pela sua região Fc, acelerando a eliminação sanguínea dos lipossomas vectorizados e comprometendo a acumulação tumoral destes (Harding *et al.*, 1997). Simultaneamente, a elevada afinidade para os respectivos receptores que caracteriza a generalidade dos anticorpos monoclonais, pode por exemplo, determinar, *in vivo*, a *retenção* dos lipossomas vectorizados na periferia da massa tumoral, comprometendo assim a sua penetração para o interior do tumor (Juweid *et al.*, 1992). Por estas ou por outras razões, têm-se de facto observado alguns casos de ausência de melhoria da eficácia terapêutica quando se pretende tratar tumores sólidos implantados subcutaneamente, com fármacos encapsulados em lipossomas vectorizados com anticorpos monoclonais, comparativamente com as formulações lipossómicas não vectorizadas.

Um dos exemplos já referido anteriormente (secção 1.4.3.1.), consiste no tratamento de um tumor gástrico com lipossomas de doxorrubicina vectorizados com o anticorpo monoclonal N-12A5 contra a glicoproteína membranar p185^{HER2} (Goren *et al.*, 1996). Devido à ausência de internalização celular dos lipossomas com anticorpo, após ligação ao receptor, o seu efeito terapêutico foi semelhante à dos mesmos lipossomas sem anticorpo.

Num outro estudo, lipossomas de doxorrubicina foram vectorizados com o anticorpo monoclonal B43.13, para um receptor específico expresso numa linha celular humana de cancro do ovário. De forma surpreendente, os lipossomas sem anticorpo foram mais

eficazes na redução da velocidade de crescimento do tumor do que os lipossomas vectorizados com o anticorpo monoclonal (Allen *et al.*, 1995a).

Um resultado que abriu novas perspectivas de aplicação destes sistemas no tratamento de tumores sólidos, surgiu com a vectorização de lipossomas de doxorrubicina com fragmentos Fab' do anticorpo monoclonal humanizado 4D5 contra a glicoproteína membranar p185^{HER2}, cuja expressão está aumentada em linhas celulares humanas de cancro da mama. Uma eficiente internalização celular (Park *et al.*, 1995; Kirpotin *et al.*, 1997) e elevada citotoxicidade (Park *et al.*, 1995) apresentada por esta formulação, a par da sua distribuição homogénea no seio do tumor (Kirpotin *et al.*, 1998), inerente também ao elevado grau de vascularização do tumor, resultou na regressão da massa tumoral associada a curas aparentes (regressão completa do tumor, sem novo ciclo de crescimento, até à data de sacrifício dos animais) (Park *et al.*, 1997). Em nenhuma das outras condições de tratamento (fármaco livre ou lipossomas de doxorrubicina sem fragmentos) foram observados estes resultados. Indubitavelmente, esta poderá vir a constituir a primeira formulação de lipossomas vectorizados a ser testada clinicamente (Park *et al.*, 2001).

1.5. OBJECTIVO E BREVE DESCRIÇÃO DO TRABALHO

A utilização clínica da generalidade dos fármacos citostáticos, nomeadamente da doxorrubicina, é limitada pelos efeitos tóxicos a eles associados. Uma das formas de ultrapassar este problema, reside na encapsulação destes fármacos em sistemas coloidais, de que se salientam os lipossomas. O desenvolvimento e a aplicação da tecnologia Stealth[®] aos lipossomas conferiu um renovado interesse a este tipo de sistemas, tendo sido determinante na alteração substancial, e de forma reprodutível, das propriedades farmacocinéticas e de biodistribuição do vector e, por conseguinte, do fármaco encapsulado. Concretamente no caso da doxorrubicina, é de registar por esta via uma acentuada alteração do seu padrão de toxicidade, bem como, um aumento da sua acumulação tumoral, e por consequência, da sua eficácia terapêutica (Papahadjopoulos *et al.*, 1991; Gabizon *et al.*, 1994). Apesar do

comprovado sucesso da utilização de lipossomas com PEG contendo doxorrubicina contra várias formas de tumores (Harrington *et al.*, 2000b; Harrington *et al.*, 2000a), a sua aplicação contra o cancro humano de pequenas células do pulmão permanece ainda por explorar.

Adicionalmente, com o intuito de melhorar o desempenho terapêutico dos fármacos encapsulados cuja acção se exerce a um nível intracelular, é importante desenvolver mecanismos eficazes de interacção específica com células *alvo* e de cedência intracelular. Neste aspecto, a versatilidade estrutural dos lipossomas tem permitido levar à prática o produto da imaginação dos investigadores. Assim, a possibilidade de acoplar covalentemente ligandos na extremidade das cadeias de PEG existentes à superfície de lipossomas, que podem ser reconhecidos e internalizados por receptores membranares específicos existentes à superfície de células tumorais, constitui uma excelente via de entrada dos lipossomas (e do fármaco encapsulado) no interior das células. Os anticorpos monoclonais de origem animal têm sido, preferencialmente, a classe de compostos utilizada como ligandos para vectorizar lipossomas. Ainda que encerrando um elevado potencial, a aplicação clínica desta estratégia é limitada pelo potencial imunogénico associado aos anticorpos monoclonais.

Este trabalho tem por objectivo desenvolver um sistema de vectorização mediado por ligandos, utilizando como base de trabalho os lipossomas com PEG contendo doxorrubicina, e estudar a sua aplicabilidade contra o cancro humano de pequenas células do pulmão. Em concreto, a abordagem deste trabalho foi realizada de um ponto de vista mecanístico e de avaliação do nível de interacção e de cedência ao nível celular (*in vitro*) e de um ponto de vista de biodistribuição e de actividade terapêutica (*in vivo*). O ligando testado foi um hexapeptídeo designado por antagonista G, o qual é um antagonista de factores de crescimento secretados pelas células tumorais de cancro humano de pequenas células do pulmão.

O trabalho desenvolvido será apresentado sob a forma de 4 capítulos distintos

(capítulos 2 a 5), organizados de acordo com os artigos científicos, entretanto, já publicados (capítulos 2 e 5), aceites (capítulo 4) ou já submetidos (capítulo 3) para publicação.

Assim, no capítulo 2 foram avaliados (*in vitro*) alguns dos mecanismos de interacção entre os lipossomas vectorizados com o antagonista G e a linha celular clássica de cancro humano de pequenas células do pulmão (H69). Para o efeito, recorreu-se à utilização de lipossomas marcados radioactivamente ou fluorescentemente (microscopia confocal). Este estudo foi depois complementado com a avaliação dos níveis de cedência intracelular e de citotoxicidade da doxorubicina, quando encapsulada em lipossomas vectorizados, ou não, pelo antagonista G. Tendo em vista uma futura utilização *in vivo* deste sistema, avaliou-se também a farmacocinética e a biodistribuição destes lipossomas (marcados radioactivamente) em ratinhos sem tumor.

A evolução das formas ditas clássicas de cancro humano de pequenas células do pulmão para formas ditas variantes, constitui um dos grandes problemas associado a este tipo de tumor. Esta transformação está associada a uma alteração fenotípica das proteínas superficiais (receptores) expressas nas células tumorais, a um aumento da proliferação celular e da resistência à quimioterapia. Neste contexto, e atendendo a que a interacção do antagonista G com as formas variantes de cancro humano de pequenas células do pulmão não está caracterizada, no capítulo 3 avaliou-se a capacidade do antagonista G em vectorizar lipossomas para uma linha celular variante de cancro humano de pequenas células do pulmão (H82). Com esta linha celular, foi igualmente estudada a actividade antiproliferativa da doxorubicina lipossómica, vectorizada ou não pelo antagonista G.

A utilização clínica dos lipossomas vectorizados por ligandos dependerá, de entre outros factores, do desenvolvimento de métodos de preparação mais simples e flexíveis. Assim, no capítulo 4 descreve-se a aplicabilidade de um novo processo de preparação de lipossomas vectorizados com antagonista G, nomeadamente, em termos da capacidade de ligação às células tumorais (linha celular H69) e da citotoxicidade desenvolvida.

No capítulo 5, avaliou-se a biodistribuição, e em particular, a acumulação tumoral de

lipossomas (marcados radioactivamente), com e sem antagonista G, em ratinhos imunodeprimidos com tumores subcutâneos resultantes da inoculação da linha celular H69. Posteriormente, utilizando este mesmo modelo, avaliou-se a actividade terapêutica de lipossomas de doxorrubicina, vectorizados ou não com antagonista G, em função da dose e do estado de desenvolvimento dos tumores.

Finalmente, no capítulo 6 apresentam-se as considerações finais e as perspectivas futuras decorrentes do trabalho realizado.



*Tese de Doutoramento
Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra
2001*

CAPÍTULO 2

Utilização de um antagonista de factores de crescimento como agente de vectorização de lipossomas estabilizados estereamente para o cancro humano de pequenas células do pulmão

RESUMO

Neste capítulo foi avaliada a capacidade de um antagonista de factores de crescimento, H-Arg-D-Trp-N^{me}Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂ (designado por antagonista G) para vectorizar, de forma específica, lipossomas estabilizados estereamente com poli(etilenoglicol) para a linha celular clássica de cancro humano de pequenas células do pulmão (H69). Nos estudos realizados, observou-se que o grau de associação celular dos lipossomas vectorizados com antagonista G (SLG) é de 21 a 37 vezes superior à associação celular de lipossomas sem antagonista G, ou vectorizados com um peptídeo não específico. Da interacção entre os SLG e as células tumorais, resulta a internalização celular dos primeiros (num máximo de 13000 SLG/célula), através de um processo mediado por receptores e que envolve a formação intracelular de vesículas revestidas com clatrina. Estudos de microscopia confocal confirmaram que esta interacção é específica para o antagonista G e para a linha celular H69. Adicionalmente, demonstrou-se que a cedência nuclear de doxorubicina é significativamente melhorada quando as células são tratadas com doxorubicina encapsulada nos SLG, traduzindo-se num aumento da actividade citotóxica relativamente à actividade do mesmo fármaco encapsulado em lipossomas sem antagonista G. Em ratinhos, os SLG marcados radioactivamente com [¹²⁵I]tiraminilulina apresentaram um tempo de semi-vida sanguíneo de 13 h. O conjunto destes resultados é revelador de que a utilização de peptídeos como o antagonista G, que se ligam às células tumorais, promovendo a internalização de lipossomas estabilizados estereamente, constitui uma estratégia promissora em terapia de cancro humano de pequenas células do pulmão.

2.1. INTRODUÇÃO

O cancro de pequenas células do pulmão é um tumor com uma elevada capacidade de metastização (Moore *et al.*, 1998), representando 25% do total de tumores pulmonares (Jones *et al.*, 1997). Nestes pacientes, apesar de ser observável uma resposta inicial à quimioterapia e à radioterapia, a doença progride rapidamente, sendo a percentagem de doentes que sobrevive 5 anos inferior a 5% (Jones *et al.*, 1997). Perante uma doença tão agressiva, é urgente o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

As células constituintes deste tipo de cancro têm a capacidade de secretar para o meio extracelular vários tipos de neuropeptídeos (também designados por factores de crescimento), os quais são susceptíveis de se ligarem a receptores existentes à superfície dessas mesmas células tumorais. Esta ligação desencadeia um conjunto de sinais intracelulares que culmina com a síntese de DNA e posterior proliferação celular (Sethi *et al.*, 1992). O conhecimento deste mecanismo de activação da proliferação celular conduziu ao desenvolvimento de substâncias, designadas por antagonistas, que bloqueiam os efeitos mitogénicos provocados pelos factores de crescimento (Figura 2.1.) (Woll e Rozengurt, 1988; Heimbrook *et al.*, 1989; Woll e Rozengurt, 1990; Mahmoud *et al.*, 1991; Bunn *et al.*, 1994; Moody *et al.*, 1995). Destaque-se dentro destes, o hexapeptídeo H-Arg-D-Trp-N^{me}Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂, designado por antagonista G (Figura 2.2.).

O antagonista G exerce a sua acção farmacológica, fundamentalmente, através do bloqueamento competitivo da acção mitogénica de vários neuropeptídeos (como por exemplo, a vasopressina e a bradiquinina), ao nível de receptores (para os quais tem diferentes afinidades relativas) existentes à superfície das células de cancro humano de pequenas células do pulmão (Woll e Rozengurt, 1990; Seckl *et al.*, 1995). Por esta razão, o antagonista G é conhecido como um antagonista de largo espectro. Recentemente, foi também demonstrado que o antagonista G é susceptível de induzir apoptose neste tipo de células tumorais, através de um mecanismo que envolve a produção de radicais livres (MacKinnon *et al.*, 1999).

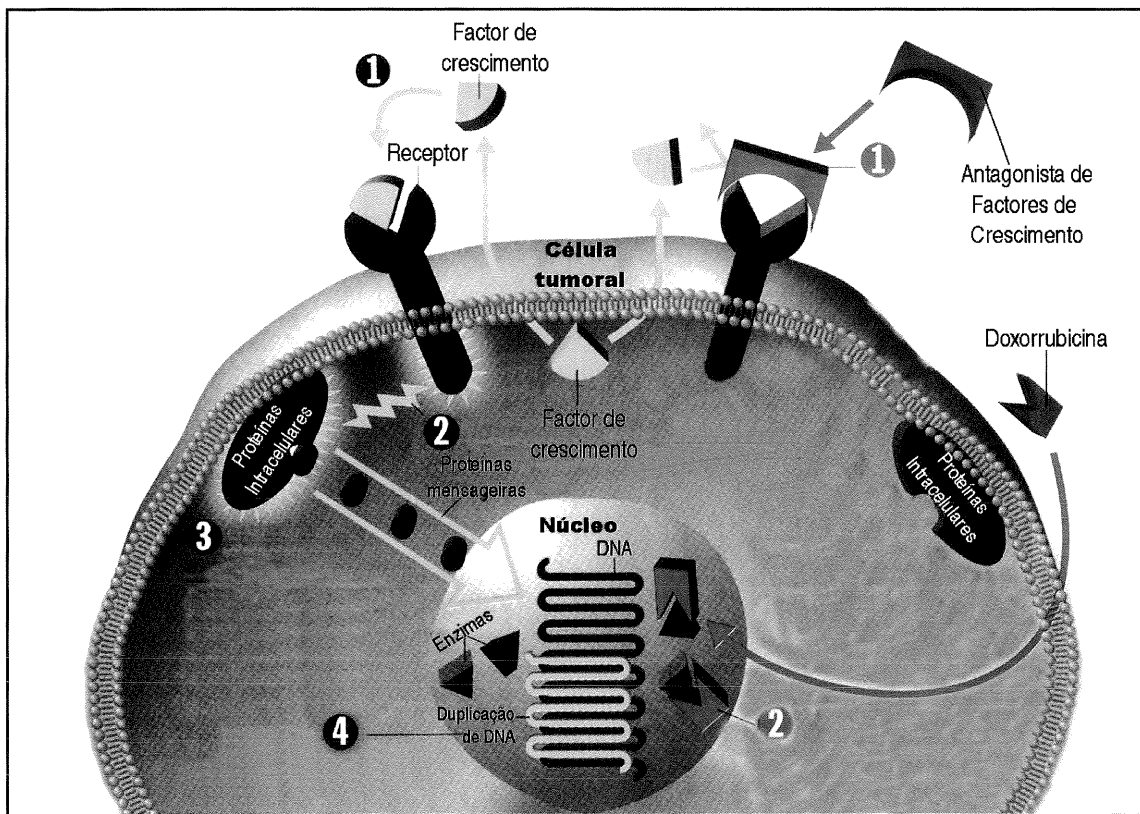


Figura 2.1. - Representação do mecanismo de ação de antagonistas de factores de crescimento e da doxorrubicina em células tumorais. Certo tipo de células tumorais têm a capacidade de secretar para o meio extracelular factores de crescimento, os quais são susceptíveis de se ligarem a receptores existentes à superfície dessas mesmas células tumorais (1). Esta ligação, desencadeia um conjunto de sinais intracelulares (2 e 3) em direcção ao núcleo da célula. Este processo culmina com a síntese de DNA por acção de enzimas específicas (4) e posterior proliferação celular. Os antagonistas dos factores de crescimento inibem a acção dos factores de crescimento, através do bloqueamento da ligação destes ao receptor celular específico (1). Desta forma, previne-se o despoletar do conjunto de sinais mitogénicos no interior da célula. A acção citotóxica da doxorrubicina, como já referido, para além de se exercer por intercalação nos pares de bases de DNA (não representado no diagrama), exerce-se também através do bloqueamento das enzimas responsáveis pela replicação do DNA, na fase S do ciclo celular (2) (adaptado de Wallis, 1998).

Embora o antagonista G seja sensível a degradação enzimática (Jones *et al.*, 1995a; Jones *et al.*, 1995b) e tenha um tempo de semi-vida sanguíneo reduzido, a par de um elevado volume de distribuição (Cummings *et al.*, 1995), demonstrou já ter a capacidade para inibir o crescimento do cancro humano de pequenas células do pulmão, tanto *in vitro* como *in vivo*

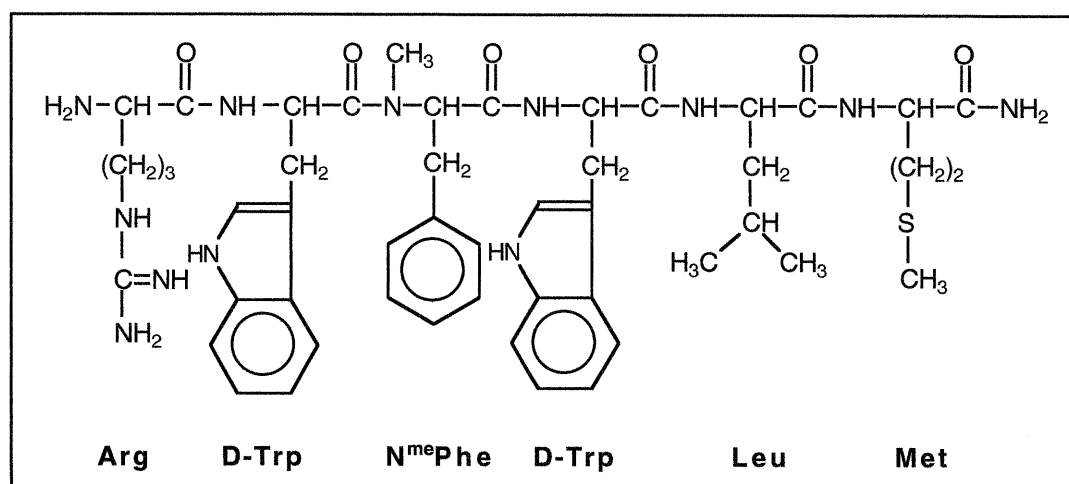


Figura 2.2. - Estrutura química do antagonista G (adaptado de Jonkman-de Vries *et al.*, 1998).

(Woll e Rozengurt, 1990; Langdon *et al.*, 1992; Sethi *et al.*, 1992). Por esta razão, o antagonista G está em fase II de ensaios clínicos para o tratamento desta patologia (MacKinnon *et al.*, 1999), constituindo um bom exemplo da nova geração de agentes terapêuticos que se poderá esperar no futuro para este tipo de doença. No entanto, actualmente, a quimioterapia a par da radioterapia constituem as principais formas de tratamento do cancro humano de pequenas células do pulmão.

Sendo os citostáticos, utilizados em quimioterapia, moléculas com um elevado grau de toxicidade, é importante que o seu transporte para o local de acção se efectue de forma tão específica quanto possível, de forma a aumentar a sua eficácia terapêutica e a diminuir os efeitos tóxicos a eles associados. Neste contexto, a encapsulação de citostáticos em lipossomas é uma estratégia de eleição. Em face do exposto no capítulo anterior, a utilização de lipossomas com um tamanho médio da ordem dos 100 nm, estabilizados estereamente com PEG e constituídos por fosfolípidos com elevada temperatura de transição de fase e colesterol, altera de forma significativa a farmacocinética e a biodistribuição dos fármacos neles encapsulados. Este tipo de lipossomas são susceptíveis de uma menor acumulação nas células do sistema monocítico fagocitário (sobretudo do fígado e do baço) e exibem tempos de semi-vida sanguíneos bastante superiores aos dos lipossomas sem PEG (Klibanov *et al.*, 1990; Allen e Hansen, 1991; Allen *et al.*, 1991b).

Os tempos de circulação plasmática prolongados, a par do tamanho reduzido, permitem a acumulação selectiva dos lipossomas com PEG em tecidos com elevada permeabilidade vascular (caso dos tumores sólidos em fase de angiogénese⁸), relativamente aos tecidos normais. Este facto contribui para o aumento da eficácia terapêutica relativamente aos protocolos baseados na administração de fármaco livre (Papahadjopoulos *et al.*, 1991; Gabizon *et al.*, 1994).

A melhoria da especificidade e da eficácia de acção de citostáticos, e nomeadamente daqueles cujos *alvos* são intracelulares, pode ser conseguida através da cedência intracelular do conteúdo dos lipossomas. Neste contexto, o acoplamento covalente de ligandos (específicos para receptores das células tumorais) na extremidade das cadeias hidrofílicas de PEG, tem-se revelado uma estratégia com grande potencial (Lee e Low, 1994; Allen *et al.*, 1995b; Hansen *et al.*, 1995; Lopes de Menezes *et al.*, 1999). Foi já demonstrado que a vectorização de lipossomas de doxorubicina com anticorpos monoclonais é susceptível de proporcionar uma melhoria da actividade terapêutica relativamente às formulações lipossómicas não vectorizadas (Ahmad *et al.*, 1993; Lopes de Menezes *et al.*, 1998). É, no entanto, de salientar que a utilização de anticorpos monoclonais como ligandos de vectorização é limitada pelos seus custos de produção e potencial imunogénico (Harding *et al.*, 1997). Indubitavelmente, moléculas mais pequenas, como, por exemplo, peptídeos ou fragmentos de anticorpos monoclonais, poderão ter um papel proeminente como agentes de vectorização de lipossomas.

Recentemente, fragmentos Fab' do anticorpo monoclonal humanizado 4D5, e reconhecidos pela glicoproteína membranar p185^{HER2}, foram utilizados para vectorizar lipossomas estabilizados estereamente com PEG, contendo doxorubicina (DXR), contra células de cancro da mama (HER2+). Daqui resultou uma clara melhoria da cedência intracelular da DXR, relativamente às formulações não vectorizadas (Kirpotin *et al.*, 1997), com a conseqüente melhoria da actividade citotóxica (Park *et al.*, 1995) e terapêutica (Park *et*

⁸ Processo de formação de novos vasos sanguíneos (Alberts *et al.*, 1983a).

al., 1997) do fármaco associado aos lipossomas vectorizados. Neste âmbito, a afinidade do antagonista G para vários receptores existentes à superfície de células de cancro humano de pequenas células do pulmão, torna-o um excelente candidato como agente de vectorização de fármacos lipossómicos para o tratamento desta forma de cancro pulmonar. Peptídeos pequenos como o antagonista G têm a vantagem, mesmo em relação aos fragmentos de anticorpos monoclonais, de serem quimicamente bem definidos e susceptíveis de serem produzidos em grandes quantidades, desprovidos de contaminantes biológicos (Boeckler *et al.*, 1999).

Neste capítulo foram avaliados os mecanismos de interacção entre lipossomas, estabilizados estereamente com PEG e vectorizados pelo antagonista G, com a linha celular clássica de cancro humano de pequenas células do pulmão (H69). Em adição, avaliou-se a eficácia relativa de cedência intracelular de DXR, encapsulada em lipossomas vectorizados ou não com antagonista G, bem como a actividade citotóxica decorrente da utilização de cada uma das formulações lipossómicas mencionadas. Tendo em vista a futura avaliação terapêutica deste sistema, foram também examinados, em ratinhos sãos, os perfis farmacocinéticos e de biodistribuição dos lipossomas com PEG e vectorizados com antagonista G. Da literatura disponível até ao momento, este trabalho constitui a primeira descrição de vectorização de lipossomas mediada por ligandos para o cancro humano de pequenas células do pulmão.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Reagentes

O antagonista G e o peptídeo designado por substância P (1-9), H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-NH₂, foram sintetizados pelo Alberta Peptide Institute (Edmonton, AB). Os lípidos fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC), metoxi

poli(etilenoglicol)2000-N-1,2-distearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) e o N-(3'-piridilditio)propionoil)amino-poli(etilenoglicol)2000-distearoilfosfatidiletanolamina (PDP-PEG-DSPE) foram gentilmente cedidos pela SEQUUS Pharmaceuticals, Inc. (Menlo Park, CA), actualmente ALZA Corporation (Mountain View, CA). O colesterol (CHOL) foi adquirido à Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Os geles para cromatografia de exclusão molecular, Sephadex G-25, Sephadex G-50 e Sepharose CL-4B foram obtidos da Pharmacia (Uppsala). Os produtos, ditiotretitol (DTT), éster hidroxisuccinimida do ácido ϵ -maleiamidocapróico (EMCS), citocalasina B, N-etilmaleiamida, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio (MTT), digitonina, $MgCl_2$ e a desoxirribonuclease (DNase) I foram adquiridas à Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). O ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etanossulfónico (HEPES) e o ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico (MES), foram adquiridos à BDH (Toronto, ON). O meio de cultura de células *Roswell Memorial Park Institute* 1640 (RPMI 1640), os antibióticos penicilina-estreptomicina e o soro fetal bovino (FBS) foram adquiridos à GIBCO BRL (Grand Island, NY). A DXR e o 8-hidroxi-1,3,6-trissulfonato de pireno (HPTS) foram adquiridos, respectivamente, à Faulding Inc. (Vaudreuil, PQ) e à Molecular Probes (Eugene, OR). O éter [$1\alpha,2\alpha(n)$ - 3H] colesteril hexadecilo, 1,48-2,22 TBq/mmol ($[^3H]CHE$) foi adquirido à Dupont New England Nuclear (Mississauga, ON). O $Na^{125}I$ e o líquido para contagem de cintilações foram adquiridos à Amersham Canada Ltd. (Oakville, ON). O IODO-GEN foi adquirido à Pierce (Rockford, IL). A tiraminilulinina (TI) foi sintetizada de acordo com o descrito por Sommerman *et al.* (1984). Todos os outros reagentes utilizados neste trabalho são de um grau de pureza analítico.

2.2.2. Linhas celulares

A linha celular clássica de cancro humano de pequenas células do pulmão, NCI-H69 (referência: ATCC HTB-119; designada correntemente neste trabalho por H69) e a linha celular Namalwa (linfoma humano; referência: ATCC CRL 1432) foram adquiridas à American Type Culture Collection (Rockville, MD). Ambas as linhas celulares foram

mantidas em meio de cultura RPMI 1640, enriquecido com FBS a 10% (v/v), previamente inactivado pelo calor (30 min a 52°C), e com penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). As células cresceram em suspensão em frascos de cultura de 75 cm² (Costar Corporation, Cambridge, MA) e foram mantidas numa incubadora à temperatura de 37°C e em atmosfera humidificada (90% de humidade) com 5% de CO₂. A manutenção das células em cultura foi realizada de forma a que elas se mantivessem na sua fase exponencial de crescimento (as células H69 foram diluídas em meio de cultura de células uma vez por semana enquanto que as Namalwa foram diluídas duas vezes por semana).

2.2.3. Preparação de lipossomas

Os lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02 (correspondente a um total de derivado lipídico de PEG de 5 mol% do conteúdo total do fosfolípido, HSPC), foram preparados por extrusão de lipossomas multilamelares (Olson *et al.*, 1979).

Em cada preparação de lipossomas, os diversos componentes lipídicos, originalmente dissolvidos em clorofórmio, foram misturados nas proporções molares acima referidas. O solvente orgânico foi depois removido sob pressão reduzida em evaporador rotativo, obtendo-se um filme lipídico que permaneceu sob vácuo e à temperatura ambiente, durante pelo menos 12 h. A hidratação do filme lipídico fez-se por agitação com vórtex à temperatura de 65°C e com um determinado volume de tampão aquoso de modo a obter uma concentração de fosfolípido de 20 mM. A constituição do tampão aquoso foi função do tipo de experiência a realizar. No caso das experiências com HPTS, a encapsulação foi realizada de forma passiva, tendo a hidratação do filme lipídico sido realizada com uma solução de HPTS 35 mM em solução tampão a pH 7,4 (HEPES 2,5 mM e NaCl 75 mM). No final, e independentemente de se ter efectuado ou não uma reacção de acoplamento, os lipossomas de HPTS foram obtidos em solução tampão de HEPES 5 mM e de NaCl 150 mM a pH 7,4 (Daleke *et al.*, 1990). Relativamente à preparação de lipossomas contendo [¹²⁵I]TI, a encapsulação foi também passiva. Neste caso, a hidratação do filme lipídico foi realizada

com uma solução de [^{125}I]TI (substância radioactiva cuja preparação se descreve na secção 2.2.9.) em solução tampão de HEPES 25 mM e de NaCl 140 mM a pH 7,4 (esta solução será designada correntemente por solução tampão de HEPES a pH 7,4). Esta é aliás a mesma solução tampão em que no final os lipossomas são obtidos. Nestas condições, e após remoção do marcador não encapsulado, os lipossomas contém 10^5 a 10^6 cpm (Allen e Hansen, 1991). A remoção do composto não encapsulado efectuou-se por passagem dos lipossomas em coluna de Sephadex G-50 (no caso do HPTS) ou de Sepharose CL-4B (no caso da [^{125}I]TI) e equilibradas na solução tampão apropriada.

Da hidratação do filme lipídico resulta a formação de lipossomas multilamelares que são depois submetidos a extrusão (em extrusor da Lipex Biomembranes, Vancouver, BC) à temperatura de 65°C . Para este efeito, utilizaram-se membranas de policarbonato (Nucleopore, Pleasanton, CA) com um diâmetro de poro, sequencialmente, de 0,2 a 0,08 μm , até à obtenção de lipossomas com um diâmetro médio aproximado de 100 nm (Olson *et al.*, 1979). A determinação do diâmetro médio dos lipossomas foi realizada por espectroscopia de autocorrelação fotónica, num aparelho Brookhaven BI-90/V7.2 (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY). Esta técnica consiste na análise das variações de intensidade resultantes da dispersão de um raio laser por partículas em suspensão (que neste caso são lipossomas) animadas de movimentos Brownianos. A análise das flutuações da intensidade da luz difractada ao longo do tempo por um autocorrelacionador permite a determinação do coeficiente de difusão das partículas e deste modo, do seu tamanho, a partir da equação de Stokes-Einstein:

$$D = (k T)/(3 \pi \eta d) \quad (\text{Equação 2.1.})$$

em que D é o coeficiente de difusão das partículas em suspensão, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η a viscosidade do meio no qual as partículas de diâmetro médio d estão em suspensão (New, 1990a).

Na preparação de lipossomas de DXR, efectuou-se a encapsulação remota do fármaco através de um gradiente de sulfato de amónio (Haran *et al.*, 1993; Bolotin *et al.*, 1994). O filme lipídico foi hidratado nas condições anteriormente referidas, mas agora com uma solução aquosa de sulfato de amónio 250 mM, a pH 5,5. Após extrusão, os lipossomas foram submetidos a cromatografia em coluna de Sephadex G-50 equilibrada com uma solução tampão de acetato de sódio 100 mM e de NaCl 70 mM, a pH 5,5, para substituir o meio exterior aos lipossomas pela referida solução tampão de acetato de sódio. Seguidamente, incubou-se durante 1 h a 65°C, um determinado volume de uma solução de DXR 10,3 mM (em solução de sacarose a 10%) com os lipossomas, numa razão ponderal DXR/fosfolípido de 0,2:1. A remoção da DXR não encapsulada foi realizada por passagem dos lipossomas em coluna de Sephadex G-50, equilibrada numa solução tampão apropriada. A quantificação da DXR encapsulada foi realizada em solução metanólica a partir da sua absorvância ao comprimento de onda de 492 nm e por recurso a uma curva de calibração. Normalmente, a eficiência de encapsulação foi da ordem dos 95 % e a quantidade de fármaco encapsulada foi, aproximadamente, de 200 µg de DXR/µmol de fosfolípido.

2.2.4. Acoplamento de antagonista G a lipossomas

Com o intuito de acoplar covalentemente o antagonista G à extremidade reactiva do PEG, os lipossomas obtidos após extrusão ou após encapsulação de DXR, foram incubados com DTT 20 mM, durante 30 min à temperatura ambiente, de forma a reduzir as ligações ditiol. Seguidamente, o DTT foi removido e o meio exterior aos lipossomas foi substituído por passagem em coluna de Sephadex G-50 equilibrada numa solução tampão de HEPES 25 mM, MES 25 mM e de NaCl 140 mM (pH 6,5). Paralelamente, preparou-se um derivado maleiamida do antagonista G, por reacção entre este peptídeo e o EMCS, numa razão molar de 1:1 (em solução tampão HEPES a pH 6,5) durante 30 min à temperatura ambiente (Fujiwara *et al.*, 1981). Este derivado maleiamida do antagonista G foi depois adicionado aos lipossomas tiolados (razão molar antagonista G/fosfolípido de 1:200), numa reacção que teve lugar durante 14 a 18 h à temperatura ambiente. Decorrido este período de tempo,

adicionou-se um excesso de N-etilmaleiamida (numa concentração cinco vezes superior à concentração de grupos tiol presentes no meio reaccional), e que reagiu durante 30 min à temperatura ambiente. Assim, bloqueiam-se os grupos tióis que não tenham reagido com o antagonista G e que, de outra forma, poderiam ser responsáveis pela ocorrência de interacções não específicas entre os lipossomas e as células tumorais.

É de salientar que, dada a possibilidade de aderência do antagonista G ao vidro, a sua activação e o seu acoplamento aos lipossomas teve lugar em frascos de vidro revestidos com silicone (Sigmacote[®], Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). De acordo com protocolo de revestimento fornecido pela Sigma, os frascos de vidro são imersos na solução de Sigmacote durante 60 min. A solução é depois removida e, após secagem à temperatura ambiente, o material de vidro é lavado com água desionizada e bi-destilada obtida pelo aparelho Millipore Milli-Q (Millipore Corporation, Bedford, MA), com o objectivo de remover produtos secundários que se formaram na sequência da reacção de revestimento.

Finda a reacção com a N-etilmaleiamida, os lipossomas são submetidos a cromatografia de exclusão molecular por passagem em coluna de Sepharose CL-4B, equilibrada numa solução tampão fisiológica constituída por HEPES 25 mM e NaCl 140 mM a pH 7,4. Com excepção dos estudos com HPTS, os lipossomas a utilizar nas restantes experiências foram sempre obtidos na solução de HEPES a pH 7,4 com a constituição agora referida. Para além da substituição da solução tampão, este passo tem como objectivo remover o excesso de N-etilmaleiamida e de antagonista G que não reagiu. A quantidade de antagonista G acoplada aos lipossomas foi determinada fluorescentemente, em solução metanólica, a um comprimento de onda de emissão de 330 nm (e a um comprimento de excitação de 288 nm) e a partir de uma curva de calibração. Normalmente, a quantidade de antagonista G acoplada aos lipossomas foi de 1 µg de antagonista G/µmol de fosfolípido. Considerando um número de $7,7 \times 10^{12}$ lipossomas/µmol de fosfolípido (Lopes de Menezes *et al.*, 1998), aquela quantidade de peptídeo corresponde, aproximadamente, a 82 moléculas de antagonista G por lipossoma.

O mesmo protocolo de acoplamento foi utilizado para acoplar aos lipossomas o

peptídeo não específico designado por substância P (1-9).

De referir que, antes de qualquer ensaio com células ou animais, os lipossomas ou qualquer outra amostra em estudo foram sempre previamente submetidos a filtração esterilizante através de filtros com 0,22 µm de diâmetro de poro (Millipore Corporation, Bedford, MA).

2.2.5. Determinação quantitativa de fosfolípido

A quantificação de fosfolípido foi realizada quer pelo método colorimétrico de Bartlett (Bartlett, 1959), quer por recurso à actividade específica inicial dos lipossomas marcados com [³H]CHE (utilizando um contador de cintilações Beckman LS-6800).

A determinação de fosfolípido segundo o método de Bartlett, baseia-se na análise colorimétrica de um complexo de fosfomolibdato que, depois de reduzido, apresenta uma coloração azul de intensidade proporcional à quantidade de fosfato inorgânico existente na amostra e resultante da hidrólise ácida dos fosfolípidos.

Em cada análise, as amostras de lipossomas foram sujeitas a hidrólise ácida com ácido perclórico a 70% (0,5 ml) em banho de areia, a uma temperatura aproximada de 200°C. Finda a digestão das amostras, e após arrefecimento dos tubos, o fosfato inorgânico foi convertido em ácido fosfomolibdico, por adição de 4,7 ml de molibdato de amónio a 0,22% em ácido sulfúrico a 2%. O ácido fosfomolibdico foi quantitativamente reduzido a azul de molibdénio por adição de 0,2 ml de reagente de Fiske e Subbarow (bissulfito de sódio a 15%, sulfito de sódio a 0,5% e ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico a 0,25%) e depois de aquecimento em banho fervente durante 15 min. Após arrefecimento, as absorvâncias foram lidas a 830 nm, tendo a quantificação de fosfato sido feita com base numa curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de ião fosfato.

No caso de utilização do marcador radioactivo [³H]CHE, a concentração de fosfolípido resulta da razão entre o número de cpm/ml e a actividade específica do referido

marcador (expressa em termos de cpm/ μ mol de fosfolípido) e que, para cada lote de lipossomas, é determinada imediatamente após a hidratação do filme lipídico.

2.2.6. Associação celular de lipossomas

As linhas celulares H69 e Namalwa (utilizada nestas experiências como uma linha celular não específica, uma vez que não apresenta receptores para o antagonista G) foram semeadas numa densidade de 1×10^6 células/poço, em placas de 48 poços (Becton Dickson, Lincoln Park, NJ). Os lipossomas estabilizados estereamente com PEG, marcados radioativamente com [3 H]CHE, com ou sem antagonista G (SLG *versus* SL), ou com o peptídeo substância P (1-9) (SLP(1-9)), o qual é um peptídeo não específico para a linha celular H69 (Reeve e Bleehen, 1994), foram adicionados ao meio contendo as células de modo a perfazer concentrações de fosfolípido entre 0,1 e 0,8 mM/poço e mantidos a 4°C durante 1 h, ou a 37°C, durante 1 a 4 h, num volume total de 0,2 ml/poço.

Nas experiências realizadas com compostos inibidores de endocitose, as células H69 (1×10^6 células/poço) foram pré-incubadas com 25 μ g/ml de citocalasina B/poço ou com 0,45 M de sacarose/poço durante 30 min a 37°C, ou apenas com tampão fisiológico (HEPES a pH 7,4) tanto a 4 como a 37°C. Os SLG foram depois adicionados de modo a perfazer uma concentração de 0,8 mM de fosfolípido/poço e incubados durante 1 h, a 4°C ou a 37°C.

Nos estudos de inibição competitiva, as células foram pré-incubadas com antagonista G livre (0 a 29 μ g de antagonista G/poço, durante 30 min a 4 ou 37°C) ou com antagonista G acoplado a lipossomas não marcados radioativamente (0 a 0,6 μ g antagonista G/poço) ou apenas com lipossomas sem antagonista G (0 a 4,8 mM fosfolípido/poço), durante 30 min a 37°C. Os SLG marcados radioativamente com [3 H]CHE ([3 H]CHE-SLG) foram depois adicionados (0,1 mM de fosfolípido/poço) e incubados durante 1 h a 4 ou 37°C. Em qualquer circunstância, o volume final foi sempre de 0,2 ml/poço.

No final da incubação, as células foram submetidas a três lavagens com um tampão fosfato salino a pH 7,4, PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na_2HPO_4 8,10 mM, KH_2PO_4 1,47 mM) e a 4°C. A quantidade final de lipossomas associada às células foi calculada a

partir da actividade específica inicial dos lipossomas marcados com [³H]CHE, tendo os resultados de associação celular sido expressos em termos de nmol de fosfolípido/10⁶ células.

Os estudos de associação celular de lipossomas foram também realizados por recurso a microscopia de varrimento laser (microscopia confocal), utilizando o HPTS como marcador do espaço aquoso dos lipossomas. Neste tipo de microscopia, o feixe de luz incide num ponto específico da amostra através de uma objectiva, a qual reduz de forma acentuada a difracção da luz. A luz emitida é depois enviada através de um diafragma estreito a um detector e seguidamente a um fotomultiplicador, o qual converte a informação óptica em sinais eléctricos. De referir que a posição do diafragma está opticamente conjugada com o ponto de focagem na amostra, eliminando a influência de qualquer tipo de luz emitida fora do ponto de focagem. Este tipo de microscopia permite obter informação sobre a estrutura interna das amostras celulares a estudar e permite ultrapassar os problemas de baixa definição de imagem inerentes à microscopia de transmissão de luz convencional, que requereria o uso de amostras translúcidas e de espessura reduzida.

Nestas experiências, as células foram semeadas numa densidade de 2x10⁶ células/poço em placas de 24 poços (Nalge Nunc International, Rochester, NY). Os lipossomas contendo HPTS, com ou sem antagonista G ou com o peptídeo substância P (1-9), foram adicionados a cada poço de modo a obter uma concentração de 0,8 mM de fosfolípido/poço, perfazendo um volume total de 0,4 ml/poço. As incubações decorreram durante 1 h à temperatura de 37°C, em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂. Após lavagem a 4°C com PBS (três lavagens), as células foram visualizadas num microscópio LSM-510 (Carl Zeiss Inc., Jena), utilizando um feixe de luz laser na gama do ultravioleta, com uma emissão a 364 nm. As células foram opticamente seccionadas e as imagens (512x512 pixel) foram obtidas com o programa informático LSM-510 (Carl Zeiss Inc., Jena). Todos os parâmetros de obtenção e de análise das imagens foram mantidos constantes, de modo a possibilitar uma comparação fidedigna entre as várias experiências

realizadas.

2.2.7. Cinética de associação celular de doxorrubicina

A cinética de associação celular de doxorrubicina foi avaliada na linha celular H69 em função do tempo (0, 2, 6, 12 e 24 h), quer ao nível da célula no seu todo, quer especificamente ao nível do núcleo, utilizando um protocolo adaptado de uma metodologia anteriormente desenvolvida (Kirchmeier *et al.*, 2001).

As células foram semeadas em frascos de cultura de células de 600 ml (Nalge Nunc International, Rochester, NY), numa densidade de 50×10^6 células/frasco. As amostras testadas nestas experiências incluíram DXR livre ou lipossomas contendo DXR, com (DXR-SLG) ou sem antagonista G (DXR-SL), ou com o peptídeo não específico substância P (1-9) (DXR-SLP(1-9)), tendo sido adicionadas de forma a obter uma concentração de 20 μM de DXR/frasco. O volume total por frasco foi de 100 ml, tendo-se utilizado um frasco por cada tempo de amostragem. As incubações decorreram à temperatura de 37°C em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂.

Ao fim de cada um dos tempos de amostragem as células de cada frasco foram recolhidas por centrifugação (170 g durante 10 min) e lavadas com 20 ml de uma solução tampão constituída por trietanolamina 10 mM, sacarose 250 mM, ácido acético 10 mM e ácido etilenodiaminotetraacético 1 mM, a pH 7,4 (solução tampão TEA) e depois ressuspensas em 4 ml na mesma solução tampão. Nesta fase, foram retiradas alíquotas de 0,1 ml da suspensão celular (designada por fracção celular total) e diluídas com 0,54 ml de solução tampão TEA, com o objectivo de posteriormente se quantificar a DXR na fracção celular total. O restante volume de suspensão celular foi submetido a um processo mecânico de ruptura à temperatura de 4°C e utilizando um homogeneizador equipado com um pistão de *teflon* e um tubo de vidro (Potter B. Braun Biotech International, Melsungen, AG). Após centrifugação a 170 g durante 10 min (4°C), recolheu-se o sobrenadante que se submeteu depois a nova centrifugação (680 g durante 2,5 min a 4°C). Nestas condições, dá-se a sedimentação da fracção nuclear a qual é depois ressuspensa em 1 ml de solução tampão

TEA. As fracções nucleares assim obtidas e a fracção celular total (em ambos os casos, num volume de 0,2 ml) foram digeridas, durante 2 h à temperatura ambiente, em 1,3 ml de solução tampão TEA, na presença de 0,01 ml de digitonina (25 mg/ml em PBS estéril), 0,01 ml de MgCl₂ (57 mg/ml em PBS estéril) e 0,05 ml de DNase I (3 mg/ml em PBS estéril). A digitonina é um agente permeabilizante da membrana nuclear e o MgCl₂ é um cofactor necessário à acção da DNase, enzima responsável pela digestão do DNA nuclear (Kirchmeier *et al.*, 2001).

No final, a fluorescência da DXR foi determinada a um comprimento de onda de emissão de 595 nm (o comprimento de onda de excitação foi de 480 nm). O valor de fluorescência registado no tempo 0 foi subtraído aos valores de fluorescência obtidos em cada um dos tempos de amostragem subsequentes, tendo os resultados sido expressos em termos de unidades de fluorescência de DXR/50x10⁶ células.

2.2.8. Citotoxicidade

A actividade citotóxica *in vitro* da DXR livre e das várias formulações lipossómicas de DXR foi avaliada com a linha celular H69 ou Namalwa, utilizando o método do MTT (Mosmann, 1983). Este é um método colorimétrico que se baseia na redução do MTT (sal de tetrazólio) num sal de formazan de cor violeta, por uma enzima mitocondrial (succinato desidrogenase) das células metabolicamente activas. As condições do ensaio devem garantir que, no final do ensaio, a quantidade de formazan produzida seja directamente proporcional ao número de células metabolicamente activas (Mosmann, 1983; Wilson, 1992).

Em cada ensaio, as linhas celulares H69 ou Namalwa foram semeadas em placas de 96 poços (Costar, Corning Incorporated, NY) numa densidade, respectivamente, de 8x10⁴ e 3x10⁴ células/poço, e incubadas com DXR livre, DXR-SL ou DXR-SLG. Controlos adicionais incluíram as seguintes amostras: antagonista G livre, SLG sem fármaco ou DXR livre misturada com SLG sem fármaco numa proporção de 200 µg de DXR/µmol de fosfolípido. Independentemente do tipo de amostra em estudo, o volume total/poço nestas experiências foi de 0,2 ml. Os períodos de incubação foram de 2, 24 ou 48 h, à temperatura

de 37°C em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂. No final da incubação, as células foram submetidas a duas lavagens com PBS estéril (à temperatura de 4°C), com o objectivo de remover a amostra que não interagiu com as células. As células foram depois mantidas em meio de cultura de células renovado, à temperatura de 37°C em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂, e até perfazer (desde o início do estudo) um total de 5 dias, para as células H69, ou um total de 2 dias, para a linha celular Namalwa. As condições de ensaio para cada uma das linhas celulares, nomeadamente, no que diz respeito ao número de células e à duração total do ensaio, foram optimizadas de modo a que as células se mantivessem sempre na sua fase de crescimento exponencial e que, por conseguinte, a quantidade final de formazan produzida fosse proporcional ao número de células metabolicamente activas.

Findo o ensaio, o meio de cultura em cada poço foi substituído por 0,05 ml de MTT (0,5 mg/ml de RPMI 1640), ao que se seguiu nova incubação à temperatura de 37°C em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂ durante 4 h. Seguidamente, o sal de formazan formado foi dissolvido em 0,1 ml de uma solução de isopropanol acidificada (HCl 40 mM em isopropanol). As soluções resultantes foram lidas num leitor de placas ELISA (Titerk Multiskan PLUS MK II plate reader, Flow Laboratories Inc., Mississauga, ON) a 570 nm, utilizando o comprimento de onda de referência de 650 nm. Os resultados foram expressos em termos de IC₅₀ (µM de DXR, ou qualquer outra unidade expressamente referida), determinados a partir de curvas dose-resposta. O IC₅₀ corresponde à concentração de amostra que produz uma redução de 50% da viabilidade celular relativamente a células que não foram submetidas a qualquer tipo de tratamento (células controlo).

2.2.9. Farmacocinética e biodistribuição de lipossomas

Nos estudos de farmacocinética e biodistribuição de lipossomas, com ou sem antagonista G, utilizou-se a [¹²⁵I]TI como marcador radioactivo do espaço aquoso dos lipossomas (Allen *et al.*, 1993).

A marcação da TI com ¹²⁵I baseia-se na oxidação do ião iodeto em solução por acção

do 1,3,4,6-tetracloro-3 α ,6 α -difenílglicouril (IODO-GEN), de que resulta a formação de uma espécie reactiva ($^{125}\text{I}\text{Cl}$) que reage rapidamente com os grupos fenólicos da tirosina, aminoácido constituinte da TI (Hermanson, 1996b). Primeiramente, 0,2 ml de uma solução de TI (25 mg/ml em solução tampão de HEPES a pH 7,4) são misturados com 185 MBq de Na^{125}I . Esta mistura é depois incubada com 4,4 mg de IODO-GEN durante 1 h à temperatura ambiente. A reacção é terminada pela adição de 0,1 ml de uma mistura constituída por $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (100 mM) e KI (50 mM) e a purificação da [^{125}I]TI resultante é realizada por passagem da mistura reaccional em coluna de Sephadex G-25, equilibrada na solução tampão de HEPES a pH 7,4 (Sommerman *et al.*, 1984).

Nos estudos de farmacocinética e biodistribuição foram utilizados ratinhos fêmea $\text{CD}_1(\text{ICR})\text{BR}$, com um peso compreendido entre 23 e 27 g, obtidos a partir da Unidade de Criação de Animais da Universidade de Alberta (Edmonton, AB). O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pelo *Health Sciences Animal Policy and Welfare Committee* da Universidade de Alberta, de acordo com o *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, publicado pelo *Canadian Council on Animal Care*. Assim, constituíram-se grupos de três ratinhos para cada tempo de amostragem e os lipossomas foram administrados numa única vez por via intravenosa (através da veia da cauda dos animais) com um volume de suspensão de lipossomas de 0,2 ml. Este volume corresponde a uma administração de 0,5 μmol de fosfolípido/ratinho (aproximadamente, 2×10^5 cpm de [^{125}I]TI). Decorridas 0,5, 2, 6, 12, 24 e 48 h após a administração dos lipossomas, os animais foram anestesiados com Halotano[®] (M.T.C. Pharmaceutical, Cambridge, ON) e sacrificados por deslocamento cervical. Foram recolhidas amostras de sangue (0,1 ml) a partir do coração, bem como os principais órgãos internos (fígado, baço, pulmões, rins e coração). A carcaça, que corresponde à parte remanescente do animal, foi também analisada. Seguidamente, efectuou-se a quantificação da radioactividade associada aos referidos tecidos num contador de radiação gama (Beckman 8000). Os resultados de biodistribuição foram expressos em termos da percentagem de cpm em cada órgão relativamente ao somatório de cpm existentes *in vivo* (i. e., somatório dos cpm existentes em todas os tecidos e órgãos recolhidos e que

equivale a 100%) em cada um dos tempos de amostragem (Allen *et al.*, 1993).

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados utilizando um programa informático de regressão não linear baseado no método dos mínimos quadrados (PKAnalyst 1.0, Micromath, Salt Lake City, UT).

2.2.10. Análise estatística

A diferença estatística entre pares de resultados foi avaliada através do teste t de student. Comparações múltiplas de IC₅₀ (Tabela 2.1.) foram efectuadas utilizando análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os resultados foram consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Associação celular de lipossomas

Com o objectivo de determinar se o acoplamento covalente do antagonista G na extremidade das cadeias de PEG vectorizaria especificamente os lipossomas para as células de cancro humano de pequenas células do pulmão, foram realizados estudos *in vitro* de associação celular de lipossomas, utilizando as linhas celulares H69 e Namalwa (controlo negativo). O termo *associação celular* é utilizado neste trabalho para indicar a combinação de dois aspectos: a ligação dos lipossomas, não específica à superfície das células ou específica a receptores celulares, e a sua internalização celular (endocitose). Com o intuito de distinguir experimentalmente entre ligação e internalização, esta última componente foi inibida através da realização de experiências à temperatura de 4°C (Lee *et al.*, 1993).

Nas experiências realizadas a 37°C ficou demonstrado que o acoplamento covalente do antagonista G ao PEG aumentou a extensão e a velocidade de associação celular dos SLG

(21 a 37 vezes) relativamente aos SL, SL na presença de antagonista G livre ou SLP(1-9) (Figura 2.3.A). Os níveis de associação celular dos SLG revelaram-se dependentes das concentrações iniciais de fosfolípido incubados com as células, parecendo atingir níveis de saturação para concentrações de fosfolípido superiores a 0,8 mM (Figura 2.3.A). Os valores máximos de associação foram alcançados para tempos de incubação de 2 h e variaram entre 0,9 e 3,3 nmol de fosfolípido/ 10^6 células, dependendo da concentração inicial de fosfolípido que foi incubado com as células (Figura 2.3.B). De salientar que o aumento da associação celular dos SLG registado entre as experiências realizadas a 4 e a 37°C, sugere a internalização dos lipossomas vectorizados com antagonista G.

No sentido de elucidar alguns dos mecanismos de interacção entre os SLG e as células H69, estas foram pré-tratadas a 37°C com sacarose 0,45 M ou citocalasina B 25 µg/ml (Figura 2.3.C). A sacarose inibe a endocitose mediada por receptores, através da inibição da formação intracelular das vesículas revestidas com clatrina a partir das invaginações de regiões específicas da membrana citoplasmática (Heuser e Anderson, 1989). A citocalasina B inibe a fagocitose mediada pelas vesículas (não revestidas pela clatrina) formadas a partir de invaginações da membrana celular, não tendo qualquer efeito ao nível da endocitose mediada por receptores (Zelphati e Szoka, 1996; Matsui *et al.*, 1997). Na sequência do pré-tratamento com sacarose (Figura 2.3.C), a associação celular dos SLG a 37°C diminuiu 51% ($P < 0,001$), relativamente ao controlo realizado à mesma temperatura e na ausência de sacarose. Na experiência com citocalasina B (Figura 2.3.C), a diminuição da associação celular dos SLG foi de apenas de 19% ($P < 0,05$).

A associação celular dos SLG com a linha celular Namalwa a 37°C é significativamente inferior (6 a 11 vezes) relativamente à observada com a linha celular H69 (Figura 2.3.D *versus* Figura 2.3.A). Estes resultados sugerem que o acoplamento covalente do antagonista G na extremidade das cadeias de PEG existente à superfície dos lipossomas, é susceptível de os vectorizar para uma população celular específica.

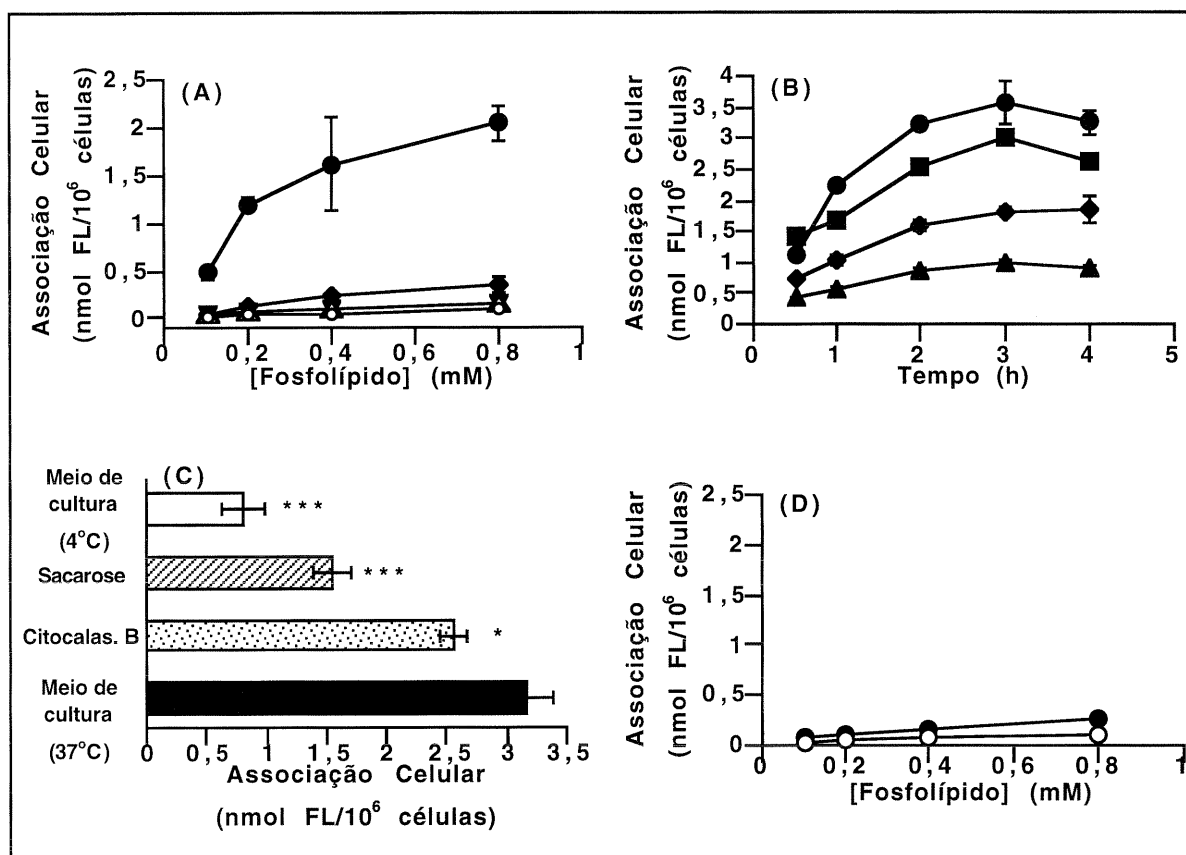


Figura 2.3. - Associação celular de várias formulações de lipossomas, marcados radioativamente com $[^3\text{H}]\text{CHE}$, com as linhas celulares H69 ou Namalwa. Lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02, foram incubados, em concentrações de fosfolípido que variaram entre 0,1 e 0,8 mM/poço, com 1×10^6 células. **(A)** Células H69 foram incubadas a 37°C durante 1 h com SL (—○—), SLP(1-9) (—▼—), SLG a 4°C (—◆—) ou a 37°C (—●—), ou SL na presença de antagonista G livre (—△—), numa razão molar de antagonista G/fosfolípido de 1:200. **(B)** Cinética de associação celular dos SLG com as células H69, incubadas com diferentes concentrações de fosfolípido a 37°C durante 4 h (0,1, —▲—; 0,2, —◆—; 0,4, —■—; e 0,8 mM, —●—). **(C)** Células H69 foram pré-incubadas a 37°C durante 30 min com citocalasina B 25 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{poço}$ (▤) ou sacarose 0,45 M/poço (▨), ou apenas em solução tampão fisiológica a 4°C (□) ou a 37°C (■). Os SLG foram depois adicionados (0,8 mM de fosfolípido/poço) e incubados durante 1 h a 4 ou a 37°C. **(D)** Células Namalwa foram incubadas com os SL (—○—) ou com os SLG (—●—) a 37°C durante 1 h. Em qualquer uma das quatro experiências realizadas, e uma vez terminado o período de incubação, as células foram submetidas a um processo de lavagem a 4°C com PBS. A quantidade de lipossomas associados às células foi determinada por contagem de cintilações e a associação celular dos lipossomas foi calculada a partir da actividade específica inicial dos lipossomas marcados com $[^3\text{H}]\text{CHE}$. Os resultados foram expressos em termos de nmol de fosfolípido (FL)/ 1×10^6 células. Os resultados são a média de 3 ou 4 amostras, \pm desvios padrão, obtidos a partir de uma experiência representativa (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

Por forma a complementar os estudos anteriores foram realizados estudos de associação celular, agora utilizando a microscopia confocal. Para este efeito, diversas formulações de lipossomas foram marcadas com o composto fluorescente hidrossolúvel HPTS (Figura 2.4.). Para um período de incubação de 1 h a 37°C, os SLG distribuem-se predominantemente ao nível da superfície e do citoplasma das células H69 (Figura 2.4.A). Mediante as mesmas condições experimentais, as células H69 incubadas com SL (Figura 2.4.B) ou SLP(1-9) (Figura 2.4.C) ou as células Namalwa incubadas com os SLG (Figura 2.4.D) ou com SL (Figura 2.4.E), não apresentam qualquer tipo de fluorescência. Estes resultados são consistentes, quer com a incapacidade de lipossomas sem antagonista G se ligarem e serem internalizados pelas células de cancro humano de pequenas células do pulmão, H69, quer com a ausência de receptores nas células Namalwa que pudessem reconhecer especificamente o antagonista G.

Seguidamente, procedeu-se à realização de estudos de inibição competitiva. Surpreendentemente, concentrações não tóxicas de antagonista G livre (0 a 29 µg/poço), pré-incubadas com 1×10^6 células H69 não inibiram competitivamente a associação celular dos [³H]CHE-SLG, nem a 37 nem a 4°C (Figura 2.5.A). Todavia, quando a pré-incubação foi realizada com os SLG não marcados radioactivamente à temperatura de 37°C, a associação celular dos [³H]CHE-SLG posteriormente adicionados, diminuiu com o aumento da quantidade de lipossomas, com o antagonista G imobilizado, pré-incubada com as células H69 (Figura 2.5.B). De forma a despistar um possível efeito dos lipossomas pré-incubados, por si, no fenómeno observado na Figura 2.5.B, efectuou-se uma pré-incubação apenas com SL exactamente nas mesmas condições experimentais (Figura 2.5.C). Os resultados obtidos demonstram que os lipossomas não exercem qualquer influência no efeito observado na associação celular dos [³H]CHE-SLG (apresentado na Figura 2.5.B).

Os níveis de inibição de 50% da associação celular dos [³H]CHE-SLG foram alcançados para uma quantidade de antagonista G imobilizado de 0,037 µg. O máximo de inibição de associação celular conseguida foi de 90%, correspondente a uma quantidade de

antagonista G immobilizado de 0,3 a 0,6 μg (Figura 2.5.B). O facto de não se ter alcançado um nível de inibição de 100% sugere a ocorrência, não muito acentuada, de uma componente de ligação celular não específica por parte dos SLG às células H69.

Os dados obtidos até ao momento sugerem que a vectorização de lipossomas promovida pelo antagonista G é específica para este ligando, bem como para as células H69 de cancro humano de pequenas células do pulmão. Da interacção entre os SLG e as células H69, resulta a endocitose dos lipossomas num processo mediado por receptores e através da

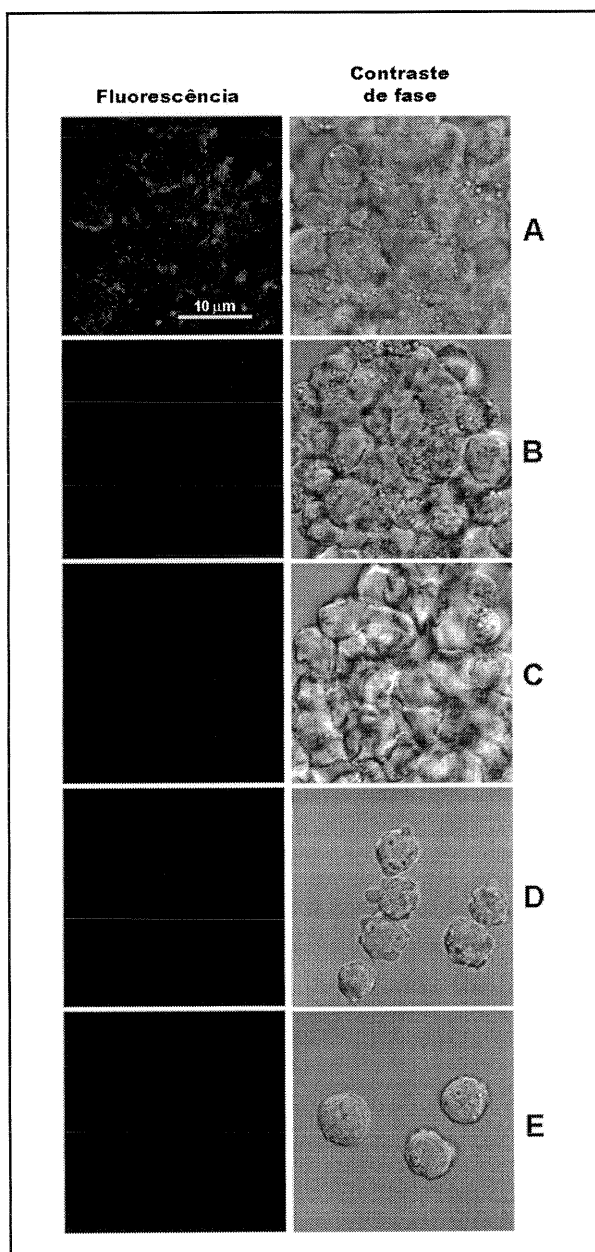


Figura 2.4. - Associação celular de lipossomas marcados fluorescentemente com HPTS, com as linhas celulares H69 ou Namalwa. Lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02, foram incubados numa concentração de 0,4 mM de fosfolípido/poço com 2×10^6 células, durante 1 h à temperatura de 37°C. As células H69 foram incubadas com (A) SLG, (B) SL ou (C) SLP(1-9). As células Namalwa foram incubadas com (D) SLG ou (E) SL. No final do período de incubação, as células foram lavadas à temperatura de 4°C com PBS e depois visualizadas num microscópio de varrimento laser. Todos os parâmetros de obtenção e de análise das imagens foram mantidos constantes, de modo a possibilitar uma comparação fidedigna entre as várias experiências realizadas.

formação intracelular das vesículas revestidas por clatrina.

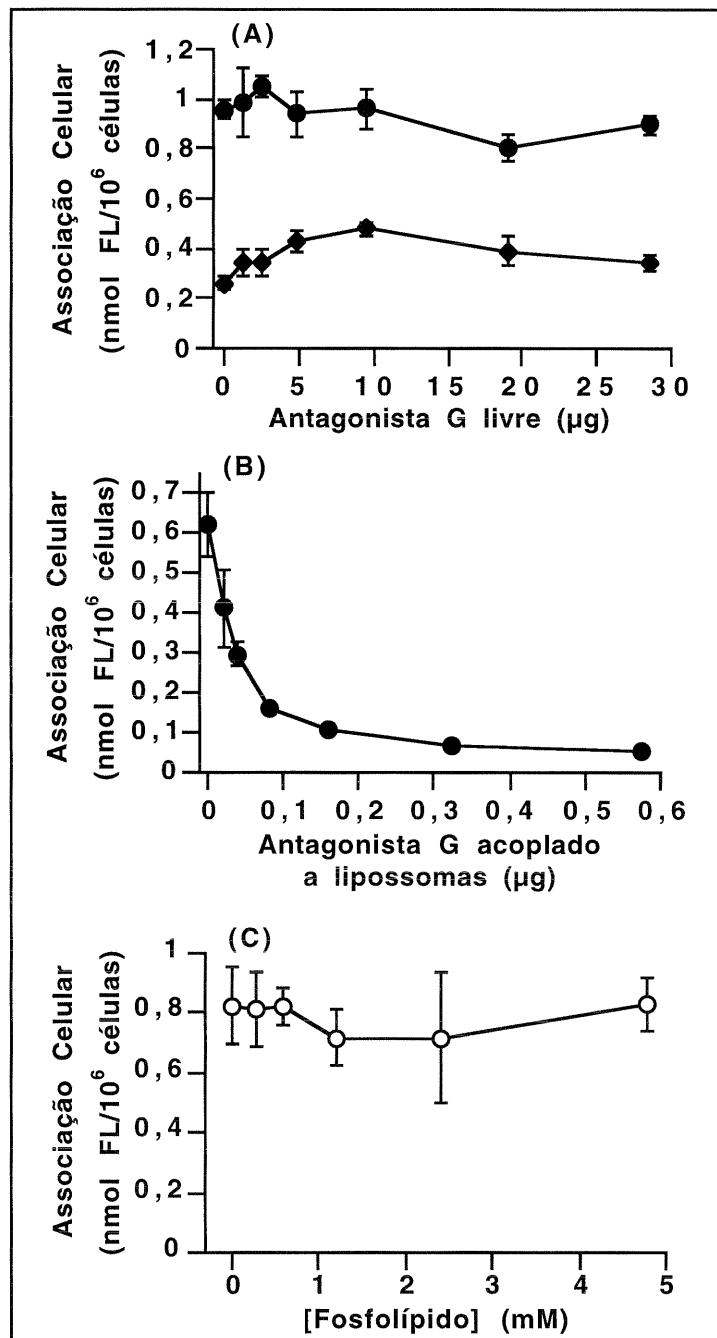


Figura 2.5. - Inibição competitiva da associação celular dos [³H]CHE-SLG com as células H69. Um milhão de células H69 foi pré-incubado durante 30 min com (A) 0 a 29 μg de antagonista G livre a 4°C (—◆—) ou a 37°C (—●—); (B) 0 a 0,6 μg de antagonista G acoplado a lipossomas (SLG), não marcados radioativamente, a 37°C (—●—) ou (C) SL (0 a 4,8 mM de fosfolípido/poço), a 37°C (—○—). Os [³H]CHE-SLG foram depois adicionados (0,1 mM de fosfolípido/poço), seguido-se um novo período de incubação durante 1 h a 4 ou a 37°C. As células foram depois lavadas com PBS a 4°C. A quantidade de lipossomas associada às células foi determinada por contagem de cintilações e a associação celular dos lipossomas foi calculada a partir da actividade específica inicial dos lipossomas marcados com [³H]CHE. Os resultados foram expressos em termos de nmol de fosfolípido/1x10⁶ células e são a média de 3 amostras, ± desvios padrão, obtidos a partir de uma experiência representativa.

Como referido na parte introdutória deste capítulo, o mecanismo de acção do antagonista G neste tipo de células tumorais, exerce-se, sobretudo, através da inibição competitiva da ligação de determinados factores de crescimento aos respectivos receptores celulares (Woll e Rozengurt, 1990; Seckl *et al.*, 1995). Com o objectivo de testar se a ligação dos SLG às células tumorais é comprometida pela acção dos factores de crescimento, efectuou-se um estudo de associação celular em meio de cultura que esteve em contacto prévio com as células tumorais durante 3 dias a 37°C (Sorenson *et al.*, 1981) (designado por meio de cultura condicionado). Nestas condições, a associação celular dos SLG apresentou apenas uma ligeira diminuição, relativamente ao perfil obtido em meio de cultura fresco (Figura 2.6.).

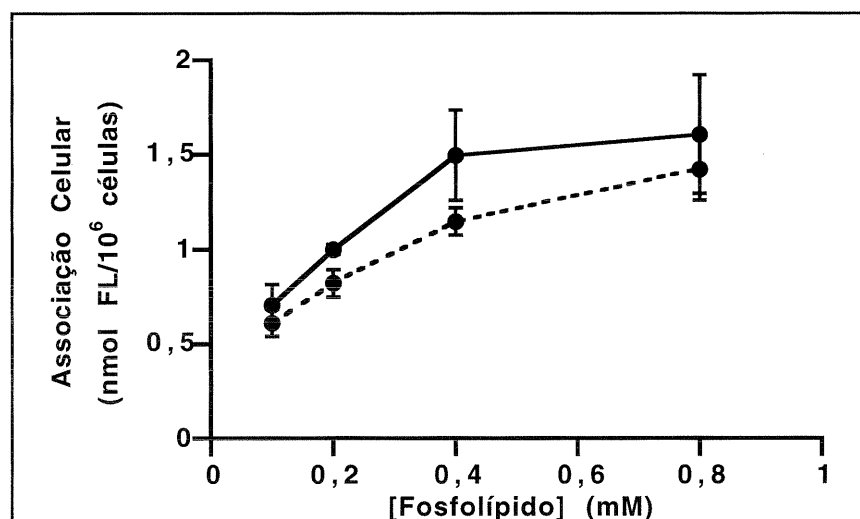


Figura 2.6. - Associação celular dos [³H]CHE-SLG com as células H69, na presença de meio de cultura fresco ou condicionado. Lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02, e com o antagonista G acoplado, foram incubados em concentrações de fosfolípido que variaram entre 0,1 e 0,8 mM/poço, com 1x10⁶ células, durante 1 h a 37°C, com meio de cultura fresco (—●—) ou com meio que esteve em contacto prévio com as células tumorais durante 3 dias a 37°C e que é designado por meio de cultura condicionado (--●--). As células foram depois lavadas com PBS a 4°C. A quantidade de lipossomas associada às células foi determinada por contagem de cintilações e a associação celular dos lipossomas foi calculada a partir da actividade específica inicial dos lipossomas marcados com [³H]CHE. Os resultados foram expressos em termos de nmol de fosfolípido/1x10⁶ células. Os resultados são a média de 3 amostras, ± desvios padrão, obtidos a partir de uma experiência representativa.

2.3.2. Cinética de associação celular de doxorubicina

O facto de um dos principais mecanismos de acção da DXR incidir sobre o DNA,

torna o núcleo um importante *alvo* intracelular. Com o objectivo de comparar a eficiência de cedência intracelular de DXR veiculada por lipossomas vectorizados pelo antagonista G e não vectorizados, avaliou-se a cinética de associação celular de DXR, ao nível da fracção celular total, bem como especificamente ao nível do núcleo das células H69, durante 24 h a 37°C (Figura 2.7.).

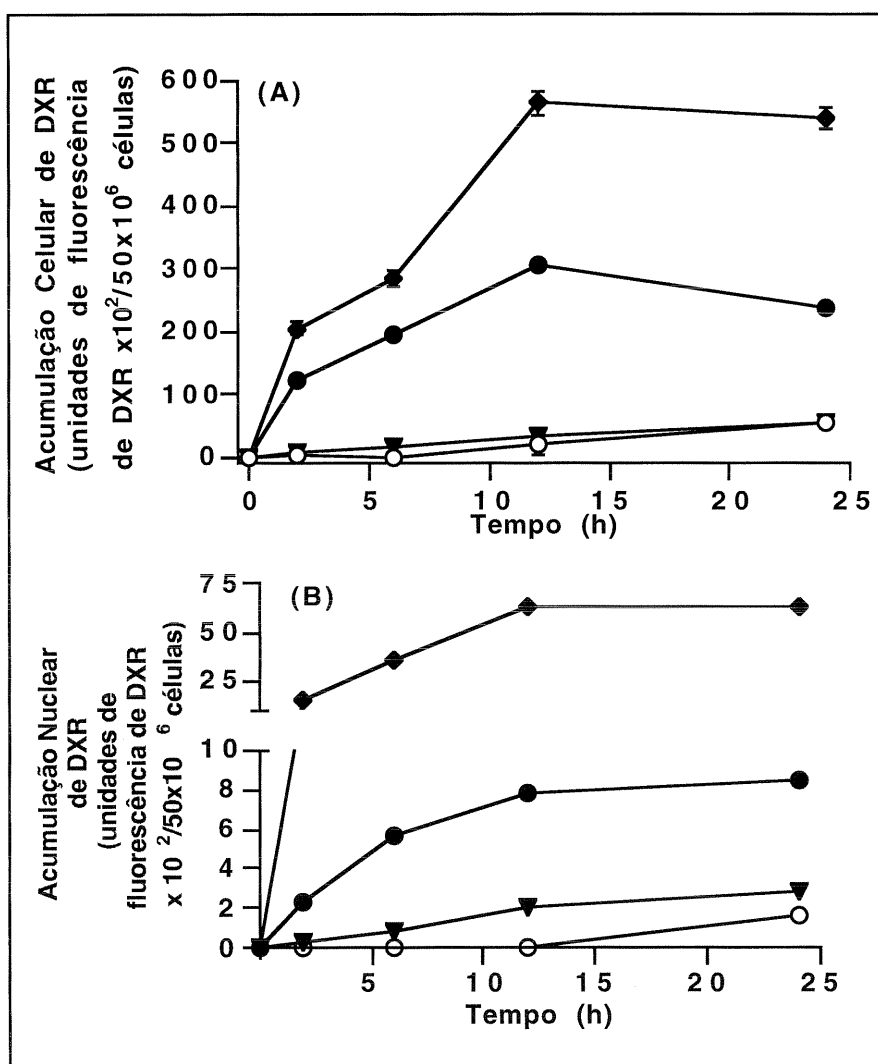


Figura 2.7. - Cinética de associação celular de DXR livre ou de várias formulações de DXR lipossômica pelas células H69. 20 µM de DXR livre (—◆—) ou de várias formulações de lipossomas contendo DXR e constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02 (DXR-SL, —○—; DXR-SLG, —●—; e DXR-SLP(1-9), —▼—), foram incubadas com 50x10⁶ células durante 24 h a 37°C. Ao fim de períodos determinados, foram retiradas alíquotas de células que depois foram lavadas e ressuspendidas em solução tampão TEA. A quantificação de DXR foi realizada (A) na fracção celular total e (B) nos núcleos isolados a partir das células H69, de acordo com o protocolo descrito na secção 2.2.7.. O valor de fluorescência registado no tempo 0 foi subtraído aos valores de fluorescência obtidos em cada tempo de amostragem subsequente, tendo os resultados sido expressos em termos unidades de fluorescência de DXR/50x10⁶ células. Os resultados são a média de 3 amostras, ± desvios padrão, obtidos a partir de uma experiência representativa.

Na fracção celular total, a acumulação de DXR livre, como esperado, foi rápida e bastante elevada, e que é consequência, quer da sua capacidade para se difundir de forma passiva através da membrana celular, quer de, *in vitro*, não ocorrer nenhum fenómeno de redistribuição semelhante ao que acontece *in vivo*, quando o fármaco livre é administrado por via intravenosa (Figura 2.7.A). A acumulação de DXR transportada via SLG (DXR-SLG), embora não tenha atingido níveis tão elevados como os de fármaco livre, foi significativamente mais rápida e mais elevada do que a acumulação de DXR transportada pelos SL ou SLP(1-9) (Figura 2.7.A). Após 6 h de incubação, a quantidade de DXR transportada pelos SLG para a célula total foi 35 vezes superior à quantidade transportada pelos SL.

A acumulação nuclear da DXR, livre ou lipossómica, foi mais lenta do que a da fracção celular total, bem como os níveis máximos de acumulação foram também inferiores (Figura 2.7.B). A quantidade e a velocidade de cedência de DXR para o núcleo pelos SLG foram inferiores às observadas para o fármaco livre (Figura 2.7.B). No entanto, decorridas 6 h de incubação, a quantidade de DXR transportada pelos SLG foi superior a 140 vezes, relativamente àquela transportada pelos SL. A acumulação de DXR livre e de DXR-SLG parece atingir níveis de saturação ao fim de 12 h, enquanto que no caso de DXR-SL e de DXR-SLP(1-9) a acumulação continua a aumentar, devido provavelmente à libertação extracelular contínua de fármaco a partir dos lipossomas. Estes dados suportam a hipótese de que fármacos lipossómicos vectorizados por intermédio de ligandos específicos para receptores susceptíveis de serem internalizados, para além de aumentarem a acumulação de fármaco ao nível das células *alvo*, proporcionam também a libertação do fármaco a partir dos compartimentos endossómicos/lisossómicos e a sua consequente chegada aos respectivos locais de acção intracelulares.

2.3.3. Citotoxicidade

Na sequência dos estudos anteriores, testou-se a citotoxicidade de várias amostras (DXR livre, DXR-SL, DXR-SLG, SLG vazios, mistura de DXR livre e SLG vazios, e

antagonista G livre) contra as células H69, para tempos de incubação de 2, 24 e 48 h (Tabela 2.1.). De referir que uma das formas de alguma maneira mimetizar a redistribuição dos fármacos *in vivo* (e simultaneamente permitir a ligação dos lipossomas vectorizados aos receptores celulares), consiste na lavagem das células decorridos os tempos de incubação referidos (Ahmad e Allen, 1992; Allen e Moase, 1996). A escolha do tempo de incubação mais curto (2 h) foi, precisamente, baseada no facto do máximo de associação celular dos lipossomas vectorizados pelo antagonista G ocorrer para um período de tempo de 2 h (Figura 2.3.B).

Para períodos de incubação de 2 e 24 h, a citotoxicidade da DXR-SLG foi aproximadamente 20 vezes superior à da DXR-SL ($P < 0,001$). Mesmo para tempos de incubação superiores (48 h), em que seria de esperar que a libertação extracelular de fármaco (e a conseqüente acumulação celular) a partir dos lipossomas não vectorizados fosse bastante

Tabela 2.1. - Citotoxicidade (IC₅₀) de várias formulações lipossómicas de DXR contra as células H69 e Namalwa.

	DXR-SL	DXR-SLG	DXR	DXR + SLG vazios	SLG vazios ($\mu\text{M FL}$) [*]	Antagonista G livre ($\mu\text{M antagonista G}$)
H69						
Tempo (h)						
2	> 200	9,59±1,33	2,46±0,93	2,28±1,14	> 1000	261±64,3
24	161±13,8	7,99±4,33	0,68±0,27	1,01±0,45	> 1000	135±15,8
48	30,6±11,8	3,35±1,20	0,64±0,28	0,82±0,13	> 1000	129±7,42
Namalwa						
Tempo (h)						
2	38,1±9,19	33,9±13,4	1,44±0,19			
24	4,34±1,65	4,04±0,16	0,36±0,03			
48	3,63±1,46	1,95±0,40	0,33±0,03			

* O IC₅₀ superior a 1000 μM de fosfolípido dos SLG vazios corresponde, para esta amostra, a um IC₅₀ superior a 1 μM de antagonista G acoplado.

As células H69 (8×10^4 /poço) e Namalwa (3×10^4 /poço) foram incubadas com diferentes amostras durante 2, 24 e 48 h. Decorridos estes períodos de incubação, as células foram lavadas e mantidas em meio de cultura renovado (sem tratamento) a 37°C, até perfazer, desde o início do estudo, 5 dias para as células H69 e 2 dias para as células Namalwa. Os resultados, expressos em termos de IC₅₀ (μM de DXR, ou qualquer outra unidade expressamente referida) são a média de 3 a 8 experiências independentes, \pm desvios padrão.

elevada, a diferença registada entre a DXR-SLG e a DXR-SL é ainda bastante acentuada (da ordem das 9 vezes; $P < 0,001$). A formulação vectorizada com antagonista G é muito mais rápida a desencadear o efeito citotóxico, demorando cerca de 2 a 24 h para atingir o seu efeito máximo. De registar que a citotoxicidade de DXR-SL após 48 h, foi ainda 3 vezes inferior à citotoxicidade obtida com a amostra DXR-SLG ao fim de 2 h ($P < 0,01$).

A capacidade da DXR livre se poder difundir rapidamente e de forma passiva através da membrana celular (Regev e Eytan, 1997), justifica que, ao fim de 2 h, a sua citotoxicidade seja cerca de 4 vezes superior à citotoxicidade da DXR-SLG ($P < 0,001$). No entanto, para períodos de incubação de 24 e 48 h as diferenças entre aquelas duas amostras deixam de ser estatisticamente significativas ($P > 0,05$). De salientar que, para todos os períodos de incubação testados, a citotoxicidade da DXR-SL foi sempre inferior à do fármaco livre ($P < 0,001$).

O elevado valor de IC_{50} apresentado pelos SLG vazios (superior a $1000 \mu\text{M}$ de fosfolípido) sugere que nem o antagonista G acoplado nem o lípido nem a combinação destes dois componentes, contribui para a actividade citotóxica observada para a DXR-SLG (no IC_{50} para esta amostra, a concentração de fosfolípido varia, aproximadamente, entre 10 e $30 \mu\text{M}$). A citotoxicidade do antagonista G livre, independentemente do tempo de incubação, foi sempre inferior à do fármaco livre ou da DXR-SLG ($P < 0,001$). Outro aspecto importante a registar, diz respeito à semelhança de valores de IC_{50} registados para a DXR livre e a mistura de DXR livre e SLG vazios ($P > 0,05$). Este dado sugere que, na actividade citotóxica inerente à DXR-SLG, não há qualquer efeito sinérgico entre a DXR, o lípido e o antagonista G acoplado.

A linha celular Namalwa, utilizada nestas experiências como um controlo negativo, apresentou a mesma sensibilidade à DXR que as células H69. Como esperado, a DXR-SL e a DXR-SLG, independentemente do tempo de incubação, não apresentaram diferenças significativas em termos de actividade citotóxica contra as células Namalwa ($P > 0,05$), uma vez que estas células não têm receptores que reconheçam especificamente o antagonista G.

2.3.4. Farmacocinética e biodistribuição de lipossomas

A farmacocinética e a biodistribuição dos SL e SLG foram avaliadas em fêmeas de ratinhos CD₁(ICR)BR, utilizando a [¹²⁵I]TI como marcador do espaço interno aquoso dos lipossomas. A [¹²⁵I]TI é um excelente marcador dos lipossomas intactos, dado que é metabolicamente inerte e, quando libertado dos lipossomas, é rapidamente eliminado do organismo por filtração renal (Sommerman *et al.*, 1984; Allen e Hansen, 1991).

Os SL e os SLG apresentaram tempos de residência médios (MRT) de, respectivamente, 25,2 e 18,4 h (Tabela 2.2.). A eliminação sanguínea dos SL ocorreu fundamentalmente através de um processo monofásico à escala logarítmica (Figura 2.8.; Tabela 2.2.), enquanto que a eliminação dos SLG apresentou um padrão bifásico, caracterizada por dois tempos de semi-vida de eliminação, $T_{1/2\alpha}$ e $T_{1/2\beta}$ (Figura 2.8.; Tabela 2.2.). Este tipo de perfil de eliminação bifásico para os SLG deve-se muito provavelmente à elevada acumulação no baço de parte dos SLG em circulação, que ocorre rapidamente após administração intravenosa (Tabela 2.3.). A área abaixo da curva da concentração sanguínea de lipossomas *versus* o tempo (AUC) para os SLG foi de 4887 nmol h/ml, valor que é aproximadamente metade do observado para os SL (10924 nmol h/ml) (Tabela 2.2.). Em adição, a constante da velocidade de eliminação do compartimento vascular, k_{10} , observada para os SLG foi mais elevada do que para os SL.

Tabela 2.2. - Parâmetros farmacocinéticos dos SLG e SL em ratinhos CD₁(ICR)BR.

Amostra	MRT ^a (h)	AUC ^b (nmol h/ml)	K_{10} ^c (h ⁻¹)	$T_{1/2\alpha}$ ^d (h)	$T_{1/2\beta}$ ^e (h)
SL	25,2	10925	0,046	0,0544	17,46
SLG	18,4	4887	0,10	0,303	13,04

Lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02, com ou sem antagonista G acoplado, e contendo o marcador radioactivo hidrossolúvel [¹²⁵I]TI, foram administrados numa única vez por via intravenosa (através da veia da cauda dos animais) com uma dose equivalente a 0,5 µmol de fosfolípido/ratinho. Após administração dos lipossomas e durante 48 h, os animais foram sacrificados, após o que se procedeu à amostragem de sangue e recolha dos seus órgãos principais. Seguidamente realizou-se a contagem de [¹²⁵I] em cada um dos tecidos recolhidos. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados utilizando o programa informático PKAnalyst 1.0. ^a tempo médio de residência; ^b área abaixo da curva da concentração sanguínea *versus* o tempo; ^c constante da velocidade de eliminação do compartimento vascular; ^d tempo de semi-vida na fase de eliminação inicial (α); ^e tempo de semi-vida na fase de eliminação terminal (β).

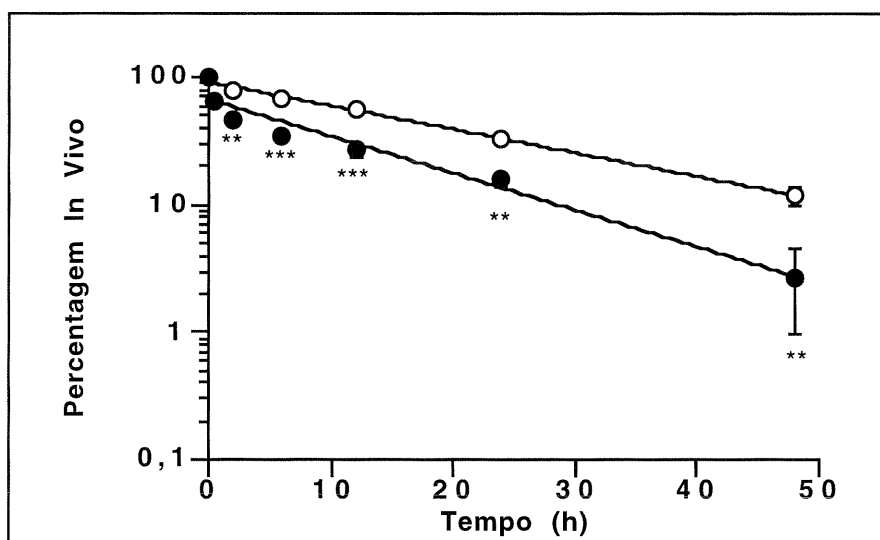


Figura 2.8. - Cinética de eliminação sanguínea dos SLG e SL em ratinhos CD₁(ICR)BR. Lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02, com (—●—) ou sem antagonista G acoplado (—○—), e contendo o marcador radioactivo hidrossolúvel [¹²⁵I]TI, foram administrados numa única vez por via intravenosa (através da veia da cauda dos animais) com uma dose equivalente a 0,5 μmol de fosfolípido/ratinho. Os resultados foram expressos em termos da percentagem de cpm em cada órgão relativamente ao total de cpm existentes *in vivo* em cada um dos tempos de amostragem. Os resultados são a média de 3 ratinhos, ± desvios padrão (** P < 0,005; *** P < 0,0005).

Apenas 30 min após a administração dos SLG, os seus níveis sanguíneos desceram para 65%, devido fundamentalmente à sua acumulação no baço (19%), a qual, para o mesmo tempo de amostragem, é bastante superior à do fígado (4,5%; Tabela 2.3.). É de registar todavia que, a cinética de eliminação para ambas as formulações de lipossomas, é dominada pela fase β de eliminação. Os SLG não deixam de apresentar um perfil de eliminação sanguínea semelhante ao de lipossomas com PEG (Figura 2.8.), tipicamente com tempos de circulação sanguínea prolongados (Allen e Hansen, 1991).

Na Tabela 2.3. reportam-se os valores de biodistribuição decorridas 0,5 a 48 h, após a administração intravenosa dos lipossomas. A acumulação dos SLG e dos SL nos pulmões, coração e rins e dos SL no baço, apresenta-se reduzida. A acumulação na carcaça após 48 h, foi mais elevada para os SL do que para os SLG, provavelmente devido à elevada acumulação destes últimos no baço. A razão subjacente a este resultado permanece desconhecida, no entanto não será de descurar a hipótese de poder ocorrer algum tipo de ligação específica do antagonista G ao nível do baço.

Tabela 2.3. - Biodistribuição dos SLG e SL em ratinhos CD₁(ICR)BR.

Amostra	Sangue	Fígado	Baço	Pulmões	Coração	Rins	Carcaça
0,5 h após administração							
SL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SLG	65,0 ±5,48	4,51 ±0,63	19,4 ±3,83	1,35 ±0,30	0,61 ±0,05	1,15 ±0,11	7,97 ±3,16
2 h após administração							
SL	79,5 ±5,86	4,61 ±1,16	0,06 ±0,08	0,25±0,25	0,36 ±0,07	1,91 ±0,39	13,2 ±5,23
SLG	47,4 ±2,81	8,42 ±1,59	25,6 ±2,94	0,81 ±0,14	0,64 ±0,09	1,10 ±0,09	16,0 ±5,18
6 h após administração							
SL	67,7 ±1,71	8,73 ±0,42	0,33 ±0,09	0,41 ±0,20	0,52 ±0,17	2,23 ±0,16	19,7 ±1,48
SLG	35,2 ±3,25	19,7 ±2,42	28,5 ±0,56	0,46 ±0,10	0,39 ±0,07	1,29 ±0,28	14,5 ±2,05
12 h após administração							
SL	56,1 ±3,37	11,9 ±1,45	1,04 ±0,35	0,74 ±0,22	0,67 ±0,13	2,85 ±0,17	26,6 ±2,17
SLG	26,6 ±2,85	22,6 ±3,04	27,3 ±4,11	0,73 ±0,08	0,31 ±0,02	1,28 ±0,30	21,1 ±1,06
24 h após administração							
SL	32,7 ±2,93	16,5 ±1,99	1,65 ±0,24	0,38 ±0,21	0,66 ±0,06	3,71 ±0,28	43,8 ±4,04
SLG	15,9 ±1,86	25,3 ±1,90	30,5 ±2,26	0,43 ±0,04	0,36 ±0,04	1,93 ±0,38	25,5 ±1,83
48 h após administração							
SL	12,1 ±1,96	20,4 ±3,10	3,57 ±0,45	0,60 ±0,19	0,72 ±0,26	5,21 ±0,44	57,5 ±4,66
SLG	2,71 ±1,76	21,8 ±0,37	39,7 ±5,54	0,64 ±0,13	0,33 ±0,04	1,88 ±0,31	32,2 ±3,28

Lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02, com ou sem antagonista G acoplado, e contendo o marcador radioactivo hidrossolúvel [¹²⁵I]TI, foram administrados numa única vez por via intravenosa (através da veia da cauda dos animais) com uma dose equivalente a 0,5 µmol de fosfolípido/ratinho. Após administração dos lipossomas e durante 48 h, os animais foram sacrificados, após o que se procedeu à amostragem de sangue e recolha dos seus órgãos principais. Seguidamente realizou-se a contagem de [¹²⁵I] em cada um dos tecidos recolhidos. Os resultados de biodistribuição foram expressos em termos da percentagem de cpm em cada órgão relativamente ao total de cpm existentes *in vivo* em cada um dos tempos de amostragem. Os resultados são a média de 3 ratinhos, ± desvios padrão. ND, não determinado.

2.4. DISCUSSÃO

O cancro humano de pequenas células do pulmão é, de entre os tumores sólidos, aquele com um potencial de metastização mais elevado e em que mais de 90% dos pacientes, à data do diagnóstico, apresentam acentuada metastização (Moore *et al.*, 1998). Como referido anteriormente, este tipo de células tumorais secreta para o meio extracelular vários factores de crescimento, cuja acção mitogénica, mediada por receptores, é susceptível de ser inibida por antagonistas específicos (Sethi *et al.*, 1992). Desta forma, sistemas lipossómicos vectorizados por aqueles antagonistas encerram um grande potencial no tratamento desta doença. No presente capítulo, demonstrou-se que lipossomas estabilizados estereamente com PEG e vectorizados pelo antagonista G, são reconhecidos e internalizados especificamente, por um processo mediado por receptores, pela linha celular clássica de cancro humano de pequenas células do pulmão, H69. Daqui resulta um aumento da acumulação intracelular de fármaco, com a consequente libertação ao nível dos locais de acção intracelulares e correspondente citotoxicidade. Em adição, estes lipossomas vectorizados apresentam tempos de circulação sanguínea prolongados, a qual constitui uma propriedade essencial para a sua aplicação *in vivo* (Papahadjopoulos *et al.*, 1991).

A identificação do receptor que medeia a internalização dos lipossomas vectorizados com antagonista G está fora do âmbito deste trabalho. Todavia, foi previamente demonstrado que o antagonista G apresenta uma elevada afinidade para o receptor da vasopressina (Woll e Rozengurt, 1990), o qual é expresso de forma acentuada no carcinoma de pequenas células do pulmão (North *et al.*, 1998). Em várias linhas celulares, este receptor tem sido descrito como sendo susceptível de internalização, embora dependente do tipo de ligando que se liga ao receptor (Lutz *et al.*, 1992), por um processo mediado pela formação intracelular de vesículas revestidas por clatrina (Hochoer *et al.*, 1992; Lutz *et al.*, 1993; Pfeiffer *et al.*, 1998). O receptor da vasopressina tem ainda a particularidade de poder ser reciclado para a superfície da membrana celular, a uma velocidade que depende do subtipo de receptor de vasopressina (Innamorati *et al.*, 1998a; Innamorati *et al.*, 1998b; Oakley *et al.*, 1999). A capacidade dos lipossomas vectorizados por ligandos

desencadearem a endocitose mediada por receptores é tida como crucial para que se exerça de forma eficaz, e na generalidade dos casos, a citotoxicidade do fármaco encapsulado (Lopes de Menezes *et al.*, 1998). Todavia, e como referido anteriormente, há que ter em linha de conta que a ligação de lipossomas vectorizados a receptores nem sempre desencadeia a sua internalização (Nässander *et al.*, 1995; Goren *et al.*, 1996).

Com base nos resultados de associação celular obtidos às temperaturas de 4 e 37°C (Figura 2.3.A) e assumindo que o número de lipossomas/ μmol de fosfolípido é de $7,7 \times 10^{12}$ (Lopes de Menezes *et al.*, 1998), é possível determinar um máximo de, aproximadamente, 13000 SLG que são internalizados por cada célula, após 1 h de incubação a 37°C. Este valor é 4,8 vezes superior ao obtido a 4°C (condição em que não ocorre endocitose; Lee *et al.*, 1993), para o mesmo período de incubação e para a mesma concentração de fosfolípido. Estes dados sugerem que os SLG, após ligação aos receptores celulares, são internalizados por um processo mediado pela formação intracelular de vesículas revestidas pela clatrina (Figura 2.3.C), sendo o receptor reciclado para a superfície da membrana celular. Nestas condições, os receptores ficam novamente disponíveis para ligar e internalizar mais SLG. Nas presentes condições experimentais, com o aumento das concentrações de fosfolípido incubadas com as células (de 0,1 para 0,8 mM), os receptores aos quais se ligam os SLG demoram entre 7 a 13 min para serem reciclados. Estes dados são demonstrativos da existência de algumas semelhanças entre os receptores que ligam SLG e os receptores da vasopressina descritos no parágrafo anterior. A fluorescência intracelular observada nas experiências de microscopia confocal constitui uma evidência adicional da endocitose dos SLG pelas células H69 (Figura 2.4.A). Como esperado, a associação celular dos SL, desprovidos de carga e de qualquer tipo agente de vectorização, foi apenas de 3 a 5% da observada para os SLG (Figura 2.3.A). Finalmente, os estudos de inibição competitiva constituem uma confirmação adicional de que a internalização dos SLG pelas células H69 é mediada por receptores.

Como referido anteriormente, a actividade antiproliferativa do antagonista G é mediada fundamentalmente pela inibição competitiva da ligação de vários factores de

crescimento a receptores específicos em células de cancro humano de pequenas células do pulmão (Woll e Rozengurt, 1990; Seckl *et al.*, 1995). A ligação do antagonista G tem lugar através dos resíduos hidrofóbicos D-Trp-N^{me}Phe-D-Trp-Leu (Woll e Rozengurt, 1990). O facto da inibição da ligação dos [³H]CHE-SLG às células H69 se ter conseguido apenas com os lipossomas vectorizados pelo antagonista G não marcados radioactivamente, e não pelo antagonista G livre (nem a 4 nem a 37°C; Figura 2.4.A), sugere a ocorrência de uma interacção multivalente (um lipossoma é susceptível de se ligar a mais do que um receptor; Figura 2.4.B). Alterações na orientação e/ou na mobilidade do peptídeo acoplado, relativamente ao peptídeo livre, poderão igualmente contribuir para as diferenças de comportamento observadas entre estas duas formas do antagonista G nos estudos de inibição competitiva. A imobilização de pequenos peptídeos à superfície de lipossomas parece constituir uma boa estratégia para, por exemplo, o desenvolvimento de vacinas sintéticas (Friede *et al.*, 1993) ou para a inibição da formação de metástases (Takikawa *et al.*, 2000). Foi também já demonstrado que a inibição da adesão celular mediada pela E-selectina em processos inflamatórios pode ser dramaticamente aumentada através do acoplamento, na extremidade das cadeias de PEG incorporado à superfície de lipossomas, de um oligossacarídeo específico reconhecido pela E-selectina (DeFrees *et al.*, 1996). Estes dados em conjunto sugerem que, nestas condições, o acoplamento de antagonistas de factores de crescimento de largo espectro na extremidade das cadeias de PEG incorporado à superfície de lipossomas, pode constituir uma forma de melhorar a sua actividade contra o cancro humano de pequenas células do pulmão.

A velocidade e a extensão de acumulação de DXR veiculada pelos SLG foram mais elevadas do que para as formulações não vectorizadas (Figuras 2.7.A e B), embora não tão rápidas quanto as observadas para a DXR livre. Embora o fármaco livre, relativamente às formulações lipossómicas, tenha a vantagem de, *in vitro*, se difundir rapidamente e de forma passiva através da membrana celular (Regev e Eytan, 1997), *in vivo* aquela vantagem desaparece por completo devido à rápida diminuição dos seus níveis sanguíneos imediatamente após administração. Este fenómeno é consequência da rápida redistribuição

do fármaco livre do compartimento vascular para outros tecidos (Gabizon *et al.*, 1994). A vantagem relativa das formulações lipossómicas de DXR vectorizadas com ligandos, relativamente ao fármaco livre, *in vivo*, foi demonstrada, de entre outros estudos, para a DXR lipossómica vectorizada com o anticorpo monoclonal anti-CD19 no tratamento de linfoma humano em modelo animal (Lopes de Menezes *et al.*, 1998).

A quantidade e a velocidade de acumulação de DXR-SLG na fracção celular total foi maior do que na correspondente fracção nuclear. Subjacentes a este facto, vários factores poderão ser considerados. A quantidade de DXR associada com a fracção celular total poderá estar sobrevalorizada devido: a contribuições de lipossomas adsorvidos não especificamente à superfície das células; à acumulação de DXR livre que foi libertada a partir de DXR-SLG antes de ter ocorrido a sua internalização; e, ao fármaco presente em lipossomas que não foram de todo internalizados. O fármaco associado com a fracção nuclear isolada pode ser proveniente da DXR libertada ao nível da superfície da célula ou da DXR libertada durante a via endocítica e a partir de DXR-SLG que foi internalizada. É possível que, uma vez alcançados os endossomas e/ou lisossomas pela DXR-SLG, ocorra a desagregação enzimática da bicamada fosfolipídica por acção de fosfolipases, com o consequente desaparecimento do gradiente protónico nos lipossomas e posterior libertação da DXR encapsulada (Goren *et al.*, 2000). A quantidade de DXR acumulada no núcleo, e que é proveniente do fármaco libertado a partir dos lipossomas existentes ao nível da superfície da célula, pode ser estimada a partir dos dados obtidos com os lipossomas não vectorizados (DXR-SL). Uma vez que a acumulação nuclear de DXR a partir da DXR-SL é bastante mais pequena do que aquela correspondente à DXR-SLG, é possível concluir que a maior parte da DXR nuclear obtida na sequência da exposição das células à DXR-SLG, resulta da libertação intracelular (ao nível dos endossomas e/ou lisossomas) a partir da correspondente DXR-SLG que foi internalizada.

O aumento da acumulação celular e nuclear de DXR quando veiculada pelos SLG e comparativamente à DXR-SL, determinou o correspondente aumento de citotoxicidade (Tabela 2.1.). Com o aumento dos tempos de incubação, as diferenças de citotoxicidade

entre SLG e SL tenderam a diminuir, confirmando desta forma observações de outros autores (Lopes de Menezes *et al.*, 1998; Goren *et al.*, 2000). Com o aumento dos tempos de incubação, aumenta a quantidade de fármaco libertado a partir dos lipossomas adsorvidos de forma não específica à superfície das células ou a partir dos lipossomas presentes no meio de cultura e, conseqüentemente, o fármaco livre (libertado) passa a ter uma contribuição sucessivamente mais acentuada com o aumento dos tempos de incubação. Os resultados obtidos com as células H69 e Namalwa, sugerem que os receptores celulares que reconhecem especificamente o antagonista G estão envolvidos no processo que desencadeia a citotoxicidade da DXR-SLG.

Os tempos de circulação sanguínea prolongados constituem um requisito fundamental para que os lipossomas possam aceder a tumores sólidos (Gabizon e Papahadjopoulos, 1988; Papahadjopoulos *et al.*, 1991; Gabizon *et al.*, 1994). Os SLG (com 1 nmol de antagonista G/ μ mol de fosfolípido) foram removidos da circulação de forma mais rápida do que os SL devido à sua componente de acumulação no baço. Todavia, é de salientar que os SLG apresentaram um perfil de eliminação típico de uma formulação lipossómica com tempos de circulação sanguínea prolongados, nomeadamente, quando comparado com o de formulações sem PEG, as quais são rapidamente removidas da circulação após administração intravenosa (Allen e Hansen, 1991). Um outro estudo com lipossomas demonstrou que o acoplamento do pentapeptídeo H-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH₂ na extremidade das cadeias de PEG (com 2,6 e 7,3 nmol de peptídeo/ μ mol de fosfolípido), não compromete a velocidade de eliminação sanguínea original dos lipossomas com PEG (Zalipsky *et al.*, 1995). Curiosamente, lipossomas vectorizados com anticorpos monoclonais, em particular, com 1 nmol de imunoglobulina G/ μ mol de fosfolípido (Allen *et al.*, 1995b) ou com 0,7 nmol do anticorpo N-12A5/ μ mol de fosfolípido (Goren *et al.*, 1996), foram rapidamente removidos da circulação. Estes resultados sugerem que os lipossomas são susceptíveis de transportar à sua superfície maiores quantidades de ligandos pequenos como os peptídeos, sem que as propriedades farmacocinéticas originais dos lipossomas com PEG sejam comprometidas. Assim sendo, o acoplamento covalente de peptídeos pequenos e terapeuticamente activos na

extremidade das cadeias de PEG existente à superfície de lipossomas, poderá constituir uma forma de melhorar a eficácia terapêutica dos lipossomas vectorizados (Zalipsky *et al.*, 1995).

A biodistribuição dos SLG é bastante diferente daquela observada para o antagonista G livre, para o qual o fígado constitui o principal local de acumulação (Cummings *et al.*, 1995). No entanto, segundo Litzinger *et al.* (1994), lipossomas com PEG e com uma gama de tamanhos entre 100 e 130 nm (correspondente ao intervalo dos valores de tamanho dos lipossomas usados nesta experiência) têm uma reduzida acumulação no fígado e no baço. Assim sendo, é de considerar a hipótese do antagonista G ser responsável pela acumulação dos SLG no baço, tanto mais que é conhecida a existência neste órgão de receptores da vasopressina (Elands *et al.*, 1990; Lolait *et al.*, 1995).

Em suma, os resultados apresentados neste capítulo são demonstrativos de que a vectorização de lipossomas estabilizados estereamente com o antagonista G constitui uma estratégia eficaz para a cedência intracelular de fármacos em células clássicas de cancro humano de pequenas células do pulmão e com potencial de aplicação *in vivo*.



*Tese de Doutoramento
Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra
2001*

CAPÍTULO 3

Vectorização e citotoxicidade de doxorubicina lipossómica contra forma variante de cancro humano de pequenas células do pulmão

RESUMO

O trabalho desenvolvido neste capítulo teve por objectivo caracterizar as interacções entre lipossomas estabilizados estereamente com PEG e vectorizados pelo antagonista G e a linha celular variante de cancro humano de pequenas células do pulmão H82. Em adição, avaliou-se também a actividade antiproliferativa da DXR encapsulada naquele sistema contra a referida linha celular. A linha celular H82, comparativamente com a linha celular clássica H69 estudada no capítulo anterior, é mais resistente a quimioterapia. A associação celular dos SLG demonstrou ser específica para o antagonista G e foi cerca de 20 a 30 vezes mais elevada do que para os SL. Concretamente, registou-se um máximo de 12000 SLG internalizados/célula após 1 h de incubação a 37°C. Estudos de microscopia confocal e estudos de inibição competitiva sugerem também que na linha celular variante H82, os SLG são internalizados por um processo mediado por receptores. O claro aumento da associação celular dos SLG, relativamente à dos SL, resultou numa melhoria substancial da cedência nuclear e da citotoxicidade da DXR encapsulada, para períodos de incubação de apenas 2 h. O conjunto de resultados obtidos coloca em evidência o potencial dos lipossomas vectorizados pelo antagonista G no tratamento de uma doença tão agressiva e heterogénea como o cancro humano de pequenas células do pulmão.

3.1. INTRODUÇÃO

No capítulo 2 desta dissertação, os resultados apresentados demonstraram que uma molécula tão pequena quanto um hexapeptídeo (antagonista G) é susceptível de ser utilizada como ligando de vectorização de lipossomas estabilizados estereamente com PEG. Concretamente, o acoplamento covalente do antagonista G na extremidade das cadeias hidrofílicas de PEG existentes à superfície de lipossomas, promoveu um claro aumento da associação destes com a linha celular clássica de cancro humano de pequenas células do pulmão, H69, relativamente aos mesmos lipossomas sem peptídeo, com a consequente melhoria da cedência intracelular e da citotoxicidade da DXR encapsulada.

No entanto, neste tipo de carcinoma, apesar da proeminência da forma dita clássica (que representa cerca de 70% do total de cancro humano de pequenas células do pulmão), existe outra, designada por variante, resultante da transformação da primeira. Esta transformação é associada a possíveis alterações da expressão de proteínas membranares (receptores), a um aumento da proliferação celular, a uma amplificação da expressão do proto-oncogene *c-myc* e a uma maior resistência à quimioterapia (Gazdar *et al.*, 1985; Fay *et al.*, 1994). Pensa-se que este conjunto de alterações registado na forma variante poderá estar relacionado com a amplificação da expressão do proto-oncogene *c-myc*. Apesar deste gene não ser expresso nas linhas celulares clássicas (Rygaard *et al.*, 1993), nas células variantes, codifica proteínas nucleares que desempenham um papel importante na regulação do ciclo celular (Cook *et al.*, 1993).

De acordo com a literatura disponível, não existe qualquer estudo que caracterize a interacção do antagonista G com linhas celulares variantes de cancro humano de pequenas células do pulmão. Assim sendo, no trabalho descrito neste capítulo procedeu-se ao estudo da interacção entre lipossomas estabilizados estereamente com PEG e vectorizados pelo antagonista G e a linha celular variante de cancro humano de pequenas células do pulmão, H82. Decorrente desta interacção, avaliou-se também a actividade antiproliferativa da DXR encapsulada.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Reagentes

A origem dos reagentes utilizados neste estudo foi já descrita na secção 2.2.1..

3.2.2. Células em cultura

A linha celular variante de cancro humano de pequenas células do pulmão, NCI-H82 (referência: ATCC HTB-175; designada de forma simplificada por H82) foi adquirida à American Type Culture Collection (Rockville, MD). Estas células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640, enriquecido com FBS a 10% (v/v), previamente inactivado pelo calor (30 min a 52°C), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). As células cresceram em suspensão em frascos de cultura de 75 cm² e foram mantidas numa incubadora à temperatura de 37°C e em atmosfera humidificada (90% de humidade) com 5% de CO₂. A manutenção das células em cultura foi realizada de forma a que elas se mantivessem na sua fase exponencial de crescimento (estas células foram diluídas duas vezes por semana com meio de cultura de células).

3.2.3. Preparação de lipossomas

Os lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02 (correspondente a um total de derivado lipídico de PEG de 5 mol% do conteúdo total do fosfolípido, HSPC), foram preparados por hidratação de um filme lipídico à temperatura de 65°C, seguido por extrusão dos lipossomas multilamelares assim obtidos (Olson *et al.*, 1979).

A preparação dos lipossomas com HPTS ou DXR foi realizada, respectivamente, por encapsulação passiva (Daleke *et al.*, 1990) ou remota (Bolotin *et al.*, 1994) dos referidos

compostos, de acordo com as metodologias descritas na secção 2.2.3.. O acoplamento covalente do antagonista G (ou do peptídeo não específico substância P (1-9)) aos lipossomas foi realizado utilizando a estratégia de acoplamento referenciada por PDP-PEG-DSPE e que foi descrita pormenorizadamente na secção 2.2.4.

A quantificação de fosfolípido foi realizada pelo método colorimétrico de Bartlett (Bartlett, 1959) ou por recurso à actividade específica inicial dos lipossomas marcados com [³H]CHE, de acordo com o mencionado na secção 2.2.5..

3.2.4. Associação celular de lipossomas

Os estudos de associação celular foram levados a cabo por incubação dos lipossomas marcados radioactivamente com [³H]CHE ou marcados fluorescentemente com HPTS (microscopia confocal), respectivamente com 1×10^6 ou 2×10^6 células H82, durante 1 h à temperatura de 37°C, de acordo com os protocolos descritos na secção 2.2.6.. Os estudos de inibição competitiva foram também realizados segundo a metodologia descrita na secção 2.2.6..

No caso das experiências realizadas com lipossomas marcados radioactivamente, a quantidade final de lipossomas associada às células foi calculada a partir da actividade específica inicial dos lipossomas marcados com [³H]CHE (de acordo com o referido na secção 2.2.5.). Os resultados de associação celular foram expressos em termos de nmol de fosfolípido/ 10^6 células.

3.2.5. Cinética de associação celular de doxorubicina

A cinética de acumulação da DXR em função do tempo (0, 2, 6, 12 e 24 h) nas células H82, foi realizada por incubação de DXR livre ou DXR lipossômica, com ou sem antagonista G, ou acoplada ao peptídeo não específico substância P(1-9), com 50×10^6 células. A acumulação do fármaco foi analisada ao nível da fracção celular total e da fracção nuclear de acordo com o protocolo adaptado de metodologia anteriormente desenvolvida

(Kirchmeier *et al.*, 2001) e descrito na secção 2.2.7.. No final, os resultados foram expressos em termos de unidades de fluorescência de DXR/50x10⁶ células.

3.2.6. Citotoxicidade

A citotoxicidade da DXR livre e lipossómica foi determinada com as células H82 por recurso ao método do MTT (Mosmann, 1983). As células H82 foram semeadas em placas de 96 poços (Costar, Corning Incorporated, NY) numa densidade de 3x10⁴/poço e incubadas com várias concentrações de DXR livre, DXR-SL, DXR-SLG, antagonista G livre, mistura de DXR livre com SLG vazios (numa razão de 200 µg de DXR/µmol de fosfolípido), durante 2, 24 ou 48 h, à temperatura de 37°C e em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂. O volume final por poço foi de 0,2 ml. No final dos tempos de incubação referidos, as células foram submetidas a duas lavagens com PBS estéril (à temperatura de 4°C), com o intuito de remover e substituir o meio com a amostra em estudo por meio de cultura de células sem qualquer tipo de fármaco. As células foram mantidas neste meio de cultura renovado até perfazer um período total de 3 dias, desde o início do estudo, à temperatura de 37°C em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi determinada de acordo com o descrito na secção 2.2.8.. Os resultados foram expressos em termos de IC₅₀ (µM de DXR, ou qualquer outra unidade expressamente referida), determinados a partir de curvas dose-resposta.

3.2.7. Libertação *in vitro* de doxorrubicina a partir de lipossomas

O estudo da libertação *in vitro* de DXR a partir de lipossomas foi efectuado através do registo do aumento da intensidade de fluorescência, em função do tempo, que ocorre mediante a libertação do fármaco para o meio de incubação. Compostos fluorescentes, como a DXR, quando em elevadas concentrações, perdem a eficiência de fluorescência em resultado das interacções entre as suas moléculas, fenómeno conhecido por efeito de filtro interno ou de auto-supressão (*self-quenching*). Contudo, mediante diluição verifica-se

proporcionalidade entre a fluorescência registada e o número de moléculas de composto fluorescente presentes. Desta forma, é possível distinguir a DXR existente no interior dos lipossomas, encapsulada numa concentração elevada, daquela que foi libertada para o meio exterior onde a sua concentração é bastante mais baixa e, conseqüentemente, estudar a estabilidade física dos lipossomas (Weinstein *et al.*, 1977; Weinstein *et al.*, 1984).

A libertação de DXR a partir de lipossomas (DXR-SL e DXR-SLG) foi avaliada durante 0 a 48 h, à temperatura de 37°C e sob agitação suave, em diferentes meios de incubação: solução tampão HEPES a pH 7,4, meio de cultura de células e plasma humano (a 25%, v/v, em solução tampão HEPES a pH 7,4). Os meios de incubação utilizados foram adicionados de penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). As determinações fluorimétricas foram realizadas num fluorímetro CytoFluor 2350 (Millipore, Bedford, MA) a 590 nm e para um comprimento de onda de excitação de 485 nm (Gaber *et al.*, 1995). A percentagem de libertação da DXR foi calculada a partir da seguinte expressão (Gaber *et al.*, 1995):

$$\text{Libertação de DXR (\%)} = ((F_i - F_0)/(F_t - F_0)) \times 100 \quad (\text{Equação 3.1.})$$

em que F_i é a intensidade de fluorescência registada ao fim de um determinado período de tempo, F_0 é a intensidade de fluorescência inicial e F_t é a intensidade de fluorescência correspondente à DXR total (não encapsulada e encapsulada nos lipossomas), registada após a adição de 25 µl/ml de suspensão lipossômica de uma solução Triton X-100 a 10%, v/v (este valor de F_t foi corrigido para a diluição introduzida pela adição de Triton X-100).

3.2.8. Análise estatística

Tal como referido na secção 2.2.10., a diferença estatística entre pares de resultados foi avaliada através do teste t de student. Comparações múltiplas de IC₅₀ (Tabela 3.1.) foram efectuadas utilizando análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os resultados foram consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Associação celular de lipossomas

Com o objectivo de testar a capacidade do antagonista G para vectorizar lipossomas estabilizados estereamente com PEG, agora para formas variantes de cancro humano de pequenas células do pulmão, foram efectuados estudos de associação celular de lipossomas com a linha celular H82 (Figura 3.1.).

A 37°C, temperatura à qual as células têm a capacidade para ligar e internalizar lipossomas, os SLG demonstraram uma associação celular, aproximadamente, 20 a 30 vezes superior àquela registada para os SL, SLP(1-9) ou SL na presença de antagonista G livre. A 4°C, registou-se uma diminuição de 2,2 a 2,7 vezes na associação celular dos SLG, em virtude de, a esta temperatura, uma das componentes da associação celular (a internalização de lipossomas pelas células tumorais) estar inibida (Figura 3.1.; Lee *et al.*, 1993).

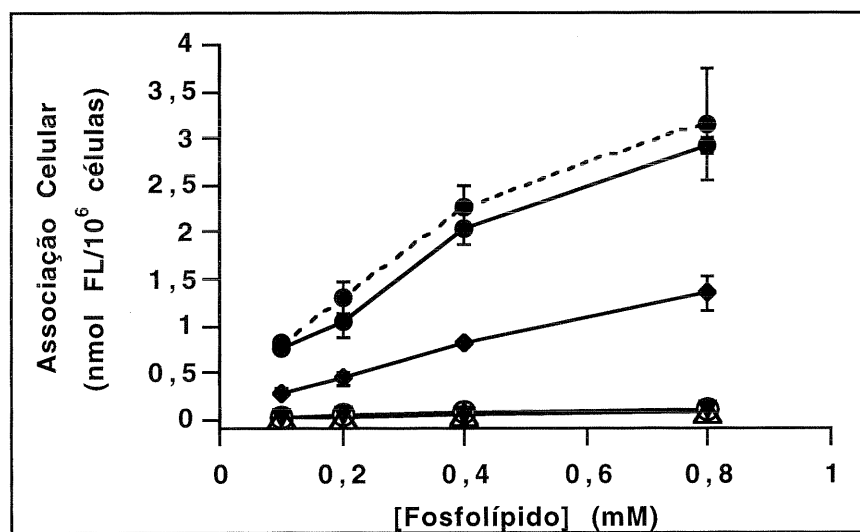


Figura 3.1. - Associação celular de várias formulações de lipossomas, marcados radioativamente com $[^3\text{H}]\text{CHE}$, com a linha celular H82. Lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02, foram incubados durante 1 h, em concentrações que variaram entre 0,1 e 0,8 mM/poço, com 1×10^6 células. As células H82 foram incubadas com SL (—○—) ou SLP(1-9) (—▼—) a 37°C, ou com SLG a 4°C (—◆—) ou a 37°C, em meio de cultura recente (—●—) ou em meio de cultura que esteve em contacto prévio com as células tumorais durante 3 dias a 37°C e que é designado por meio de cultura condicionado (—●—). Noutra experiência, as células foram ainda incubadas com SL na presença de antagonista G livre (—△—), numa razão molar de antagonista G/fosfolípido de 1:200. Em qualquer uma das experiências realizadas, uma vez terminado o ensaio, as células foram submetidas a um processo de lavagem a 4°C com PBS. A quantidade de lipossomas associados às células foi determinada por contagem de cintilações e a associação celular dos lipossomas foi calculada a partir da actividade específica inicial dos lipossomas marcados com $[^3\text{H}]\text{CHE}$. Os resultados foram expressos em termos de nmol de fosfolípido/ 1×10^6 células. Os resultados são a média de 3 ou 4 amostras, \pm desvios padrão, obtidos a partir de uma experiência representativa.

No sentido de avaliar se a internalização dos SLG pelas células H82 é o resultado de um processo mediado por receptores, efectuaram-se estudos de inibição competitiva com diferentes quantidades (não tóxicas) de antagonista G livre, tanto a 4 como a 37°C (Figura 3.2.A). Nestas condições, a associação celular dos [³H]CHE-SLG não foi inibida, mesmo para as quantidades mais elevadas de antagonista G livre. Tal como verificado no capítulo 2 com a linha celular H69, também com as células H82 a associação celular dos [³H]CHE-SLG diminuiu apenas quando a pré-incubação se realizou com quantidades crescentes de SLG (não marcados radioactivamente; Figura 3.2.B). A ausência de qualquer efeito na associação celular dos [³H]CHE-SLG quando a pré-incubação se efectuou com SL (Figura 3.2.C), confirma que o efeito observado na Figura 3.2.B se deve apenas ao antagonista G imobilizado. A quantidade de antagonista G acoplado a lipossomas necessária para inibir em 50% a associação celular dos [³H]CHE-SLG foi de 0,03 µg.

Sendo o mecanismo de acção do antagonista G exercido fundamentalmente pela inibição competitiva da ligação de factores de crescimento a receptores superficiais existentes nas células de cancro humano de pequenas células do pulmão (Woll e Rozengurt, 1990; Seckl *et al.*, 1995), avaliou-se se, para a forma variante deste tipo de tumor, a secreção daqueles factores de crescimento poderia interferir com a vectorização de lipossomas mediada pelo antagonista G. Para este efeito, e tal como no capítulo anterior, efectuou-se um estudo de associação celular na presença de meio cultura que esteve em contacto com as células tumorais durante 3 dias à temperatura de 37°C e em atmosfera com 90% de humidade e 5% de CO₂. Nestas condições experimentais, os factores de crescimento secretados pelas células tumorais não interferiram de todo com a associação celular dos [³H]CHE-SLG (Figura 3.1.).

Finalmente, a associação dos SLG com as células H82 foi também examinada por recurso a microscopia confocal. Decorrida 1 h de incubação a 37°C, as imagens opticamente seccionadas das células tumorais revelaram que os SLG marcados fluorescentemente com o HPTS se distribuem tanto à superfície das células como ao nível intracelular (Figura 3.3.A). Nas mesmas condições experimentais, não foi detectada qualquer fluorescência quando se

procedeu à incubação das células quer com SL (Figura 3.3.B) quer com SLP(1-9) (Figura 3.3.C), ambas contendo HPTS.

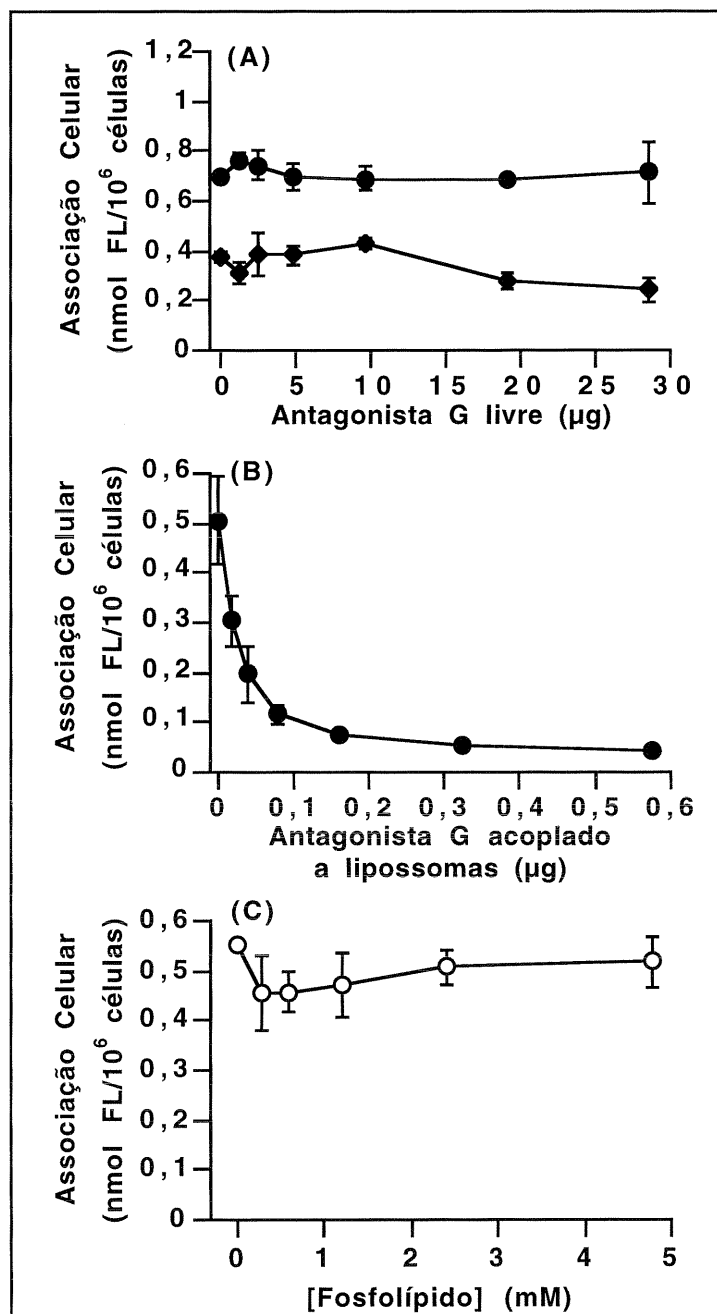


Figura 3.2. - Inibição competitiva da associação celular dos [3H]CHE-SLG com as células H82. Um milhão de células H82 foram pré-incubadas durante 30 min com (A) 0 a 29 µg de antagonista G livre a 4°C (◆) ou a 37°C (●); (B) 0 a 0,6 µg de antagonista G acoplado a lipossomas (SLG), não marcados radioativamente, a 37°C (●) ou (C) SL (0 a 4,8 mM de fosfolípido/poço), a 37°C (○). Seguidamente, foram adicionados os [3H]CHE-SLG (0,1 mM de fosfolípido/poço), seguido de novo período de incubação durante 1 h a 4 ou a 37°C. As células foram depois lavadas com PBS a 4°C. A quantidade de lipossomas associados às células foi determinada por contagem de cintilações e a associação celular dos lipossomas foi calculada a partir da actividade específica inicial dos lipossomas marcados com [3H]CHE. Os resultados foram expressos em termos de nmol de fosfolípido/1x10⁶ células e são a média de 3 amostras, ± desvios padrão, obtidos a partir de uma experiência representativa.

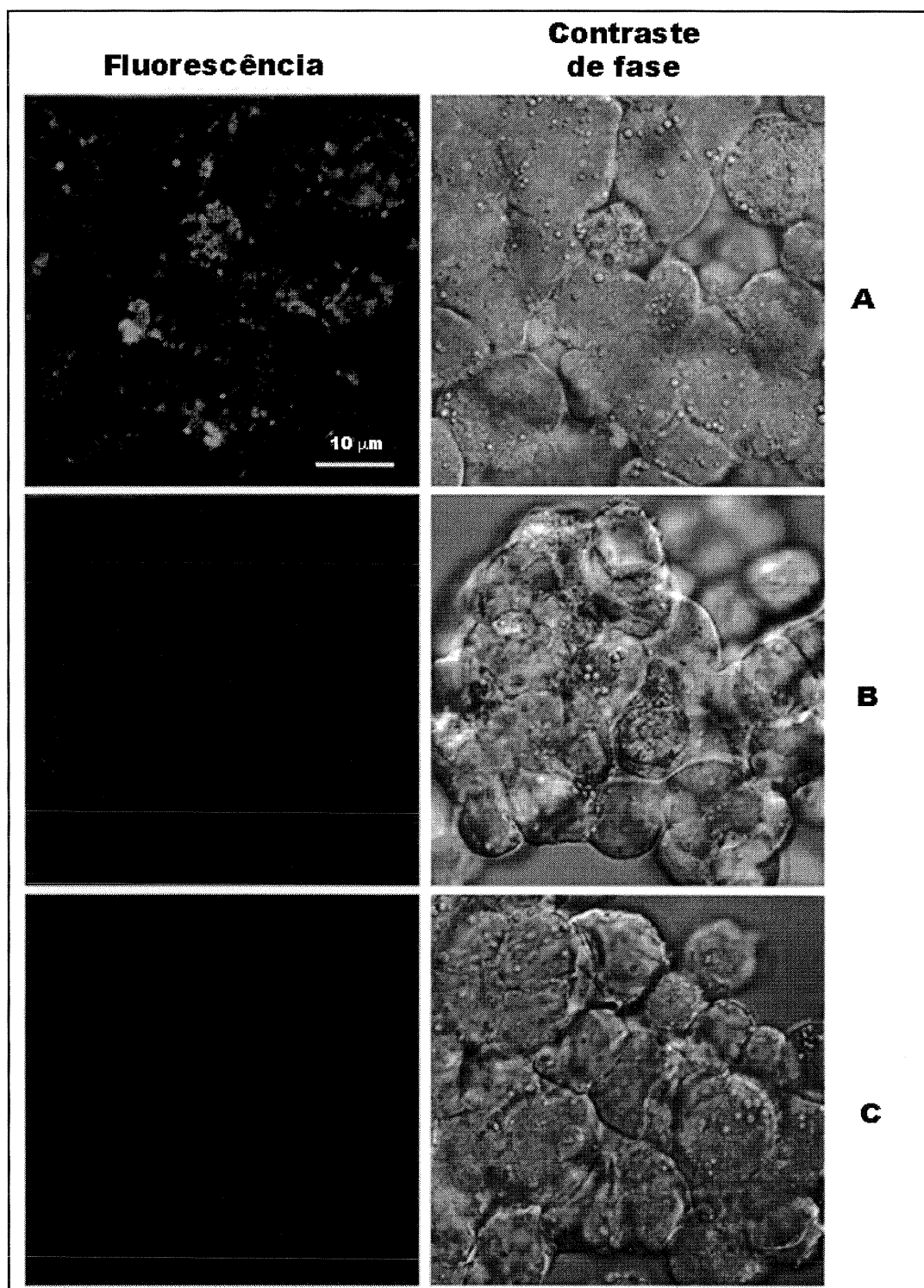


Figura 3.3. - Associação celular de lipossomas marcados fluorescentemente com HPTS, com a linha celular H82. Lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02, foram incubados numa concentração de 0,4 mM de fosfolípido/poço com 2×10^6 células, durante 1 h à temperatura de 37°C. As células H82 foram incubadas com (A) SLG, (B) SL ou (C) SLP(1-9). No final do período de incubação, as células foram lavadas à temperatura de 4°C com PBS e depois visualizadas num microscópio de varrimento laser. Todos os parâmetros de obtenção e de análise das imagens foram mantidos constantes, de modo a possibilitar uma comparação fidedigna entre as várias experiências realizadas.

3.3.2. Cinética de associação celular de doxorubicina

Na sequência dos estudos anteriores foi avaliada a eficiência com que os SLG são susceptíveis de promover a cedência intracelular de DXR no caso da forma variante de cancro humano de pequenas células do pulmão. Para o efeito, efectuou-se um estudo cinético de acumulação de DXR nas células H82, tanto ao nível da fracção celular total como da fracção nuclear, que decorreu durante 24 h a 37°C (Figura 3.4.).

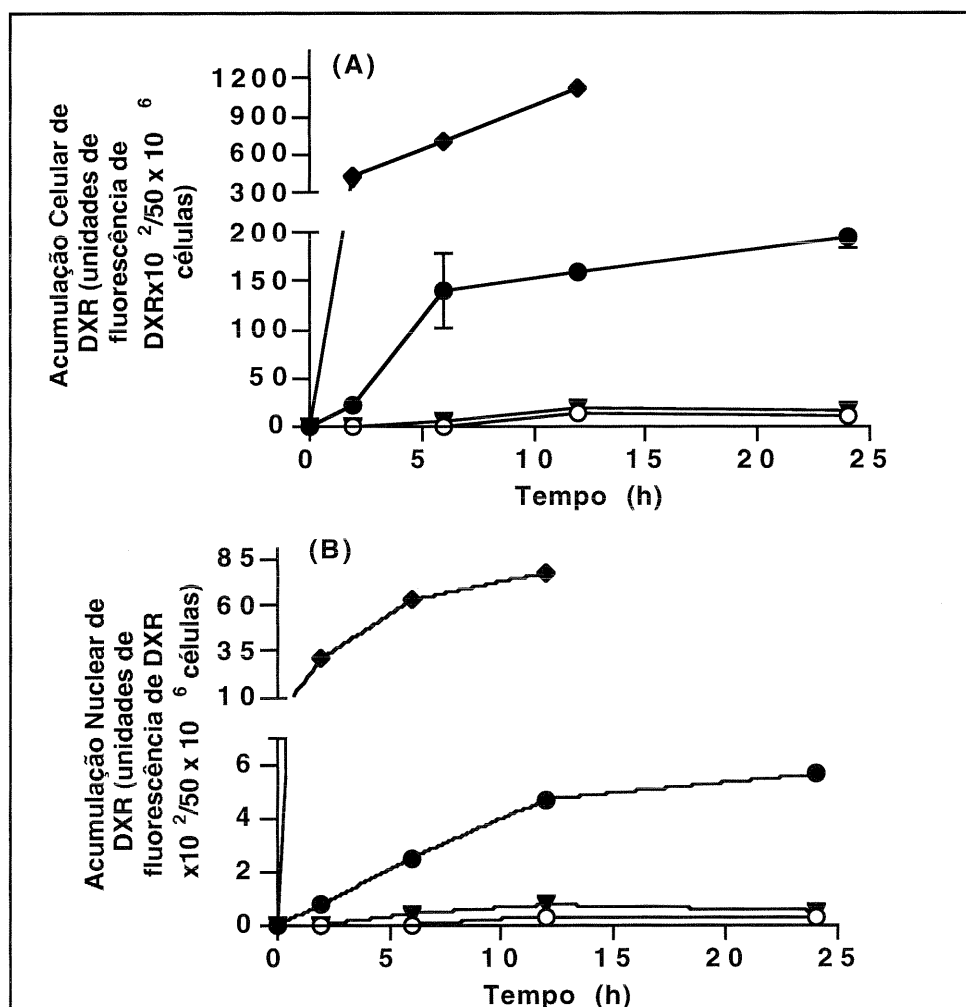


Figura 3.4. - Cinética de associação celular de DXR livre ou de várias formulações de DXR lipossómica pelas células H82. 20 μ M de DXR livre (—◆—) ou de várias formulações de lipossomas contendo DXR e constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02 (DXR-SL, —○—; DXR-SLG, —●—; e DXR-SLP(1-9), —▼—), foram incubadas com 50×10^6 células durante 24 h a 37°C. Ao fim de períodos determinados, foram retiradas alíquotas de células que depois foram lavadas e ressuspensas em solução tampão TEA. A quantificação de DXR foi realizada (A) na fracção celular total e (B) nos núcleos isolados a partir das células H82, de acordo com o protocolo descrito na secção 2.2.7.. O valor de fluorescência registado no tempo 0 foi subtraído aos valores de fluorescência obtidos em cada tempo de amostragem subsequente, tendo os resultados sido expressos em termos de unidades de fluorescência de DXR/50x10⁶ células. Os resultados são a média de 3 amostras, \pm desvios padrão, obtidos a partir de uma experiência representativa.

Os resultados obtidos demonstraram que quando encapsulada nos SLG, a acumulação de DXR, tanto na fracção celular total como na fracção nuclear, é mais rápida e mais elevada (cerca de 20 a 30 vezes), do que quando o seu transporte é efectuado pelos SL ou pelos SLP(1-9). De registar que a acumulação de DXR na fracção celular total, quando veiculada pelos SLG, foi mais rápida do que no núcleo e estabilizou ao fim de 6 h. No caso do núcleo, a estabilização da acumulação de DXR verificou-se apenas ao fim de 12 h. Este facto, tal como referido para a linha celular H69, poderá estar relacionado com a velocidade de libertação do fármaco a partir dos endossomas (Kirchmeier *et al.*, 2001).

Em virtude das características físico-químicas da DXR e como esperado, a acumulação do fármaco livre nas duas fracções celulares em análise, ocorreu de forma mais rápida e em maior extensão do que qualquer uma das formas lipossómicas de DXR estudadas. Como referido anteriormente, este resultado não se traduz necessariamente *in vivo* numa maior acumulação tumoral do fármaco livre relativamente à sua forma lipossómica, devido ao elevado volume de distribuição do primeiro (Gabizon *et al.*, 1994).

3.3.3. Citotoxicidade

A maior diferença entre a forma variante e clássica de cancro humano de pequenas células do pulmão reside na maior resistência à quimioterapia da primeira. Neste contexto, e em face dos resultados já apresentados, torna-se crucial a avaliação relativa da citotoxicidade das formulações em estudo, em células variantes de cancro humano de pequenas células do pulmão (Tabela 3.1.).

No caso das células H82, é de salientar que para tempos de incubação tão curtos quanto 2 h, a DXR-SLG apresentou o mesmo nível de citotoxicidade que a DXR livre ($P > 0,05$) e foi cerca de 35 vezes mais tóxica do que a DXR-SL ($P < 0,001$). Para períodos de incubação de 24 e 48 h, as diferenças de citotoxicidade entre a DXR-SLG e o fármaco livre não são estatisticamente significativas ($P > 0,05$), enquanto que as diferenças entre a DXR-SLG e a DXR-SL, embora tenham diminuído, são ainda estatisticamente significativas ($P < 0,001$).

Tabela 3.1. - Citotoxicidade (IC₅₀) de várias formulações lipossômicas de DXR contra as células H82.

Tempo (h)	DXR-SL	DXR-SLG	DXR	DXR + SLG vazios	SLG vazios (µM FL)*	Antagonista G livre (µM antagonista G)
2	> 200	5,70±3,7	3,40±1,2	2,20±0,2	> 1000	148±4,4
24	60,9±22,9	5,50±4,9	1,20±0,2	1,10±0,2	> 1000	57,8±7,2
48	21,3±7,7	6,40±2,8	0,60±0,5	0,80±0,6	> 1000	39,3±19,5

* O IC₅₀ superior a 1000 µM de fosfolípido dos SLG vazios corresponde, para esta amostra, a um IC₅₀ superior a 1 µM de antagonista G acoplado.

As células H82 (3x10⁴/poço) foram incubadas com diferentes amostras durante 2, 24 e 48 h. Decorridos estes períodos de incubação, as células foram lavadas e mantidas em meio de cultura renovado (sem tratamento) a 37°C, até perfazer 3 dias desde o início do estudo. Os resultados, expressos em termos de IC₅₀ (µM de DXR, ou qualquer outra unidade expressamente referida), são a média de 3 a 7 experiências independentes, ± desvios padrão.

A ausência de quaisquer diferenças de citotoxicidade entre a DXR livre e mistura de fármaco livre e SLG vazios (misturados numa razão de 200 µg de DXR/µmol de fosfolípido), independentemente do tempo de incubação, sugere a ausência de qualquer efeito sinérgico entre a DXR e qualquer um dos componentes constituintes dos lipossomas. Os valores de IC₅₀ correspondentes aos tratamentos com SLG vazios e com antagonista G livre, muito mais elevados do que as correspondentes concentrações de fosfolípido e de antagonista G (acoplado) aquando da determinação do IC₅₀ da DXR-SLG, confirmam que a actividade citotóxica observada para esta amostra se deve exclusivamente à eficiência da cedência intracelular de DXR que ela proporciona.

3.3.4. Libertação *in vitro* de doxorrubicina a partir de lipossomas

Os estudos de libertação *in vitro* de DXR a partir de lipossomas foram realizados com o objectivo de comprovar que a eficiência da cedência intracelular da DXR veiculada pelos SLG (Figuras 2.7.B e 3.4.B), bem como a actividade citotóxica daqui decorrente (Tabelas 2.1. e 3.1.), se deveu à capacidade dos lipossomas acederem ao espaço intracelular através do antagonista G (acoplado covalentemente) e não a uma libertação prematura do fármaco

encapsulado no espaço extracelular, e anterior à internalização dos lipossomas.

Os resultados obtidos nos vários meios de incubação e decorridas 36 h de incubação (Figura 3.5.) são demonstrativos da ausência de diferenças substanciais entre a DXR-SL e a DXR-SLG, em termos da percentagem de libertação de DXR. É todavia de registar que para ambas as formulações testadas se verificou uma maior percentagem de libertação de DXR em meio de cultura de células e em plasma humano, relativamente à incubação em solução tampão de HEPES a pH 7,4. Este efeito é provavelmente o resultado da acção de proteínas plasmáticas existentes nos dois primeiros meios de incubação.

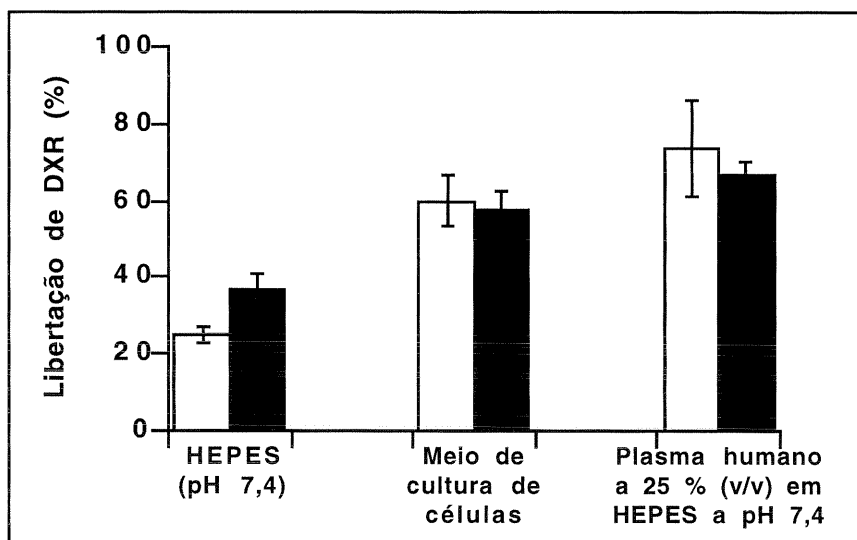


Figura 3.5. - Libertação *in vitro* de DXR a partir de lipossomas em diferentes meios e após incubação durante 36 h a 37°C. A libertação de DXR a partir de DXR-SL (□) e de DXR-SLG (■) foi determinada a 37°C e sob agitação suave, em solução tampão HEPES a pH 7,4, em meio de cultura de células (meio de cultura RPMI 1640, enriquecido com FBS a 10%, v/v, previamente inactivado) ou em plasma humano (a 25%, v/v, em solução tampão HEPES a pH 7,4). Os resultados foram expressos em termos da percentagem de libertação da DXR encapsulada de acordo com o descrito na secção 3.2.7. e são a média de 4 a 6 amostras, \pm desvios padrão, obtidos a partir de uma experiência representativa.

Estes resultados confirmam assim que o acoplamento covalente do antagonista G não afecta a integridade física dos lipossomas. Em adição, reforçam a ideia de que a actividade citotóxica que decorre da encapsulação da DXR nos SLG se deve, predominantemente, à capacidade desta formulação em promover a cedência intracelular do fármaco.

3.4. DISCUSSÃO

Como já referido anteriormente, a proliferação do cancro humano de pequenas células é em larga medida determinada pela capacidade daquelas células secretarem factores de crescimento (como a vasopressina e a bradiquinina) para o meio extracelular. A ligação daqueles factores de crescimento a receptores existentes à superfície destas células tumorais desencadeia um conjunto de sinais intracelulares que culminam com a síntese de DNA e consequente divisão celular (Sethi *et al.*, 1992). Um dos aspectos que contribui para a dificuldade de tratamento desta forma de carcinoma pulmonar resulta do facto das células tumorais originais (designadas por forma clássica), sensíveis a quimioterapia, poderem evoluir para uma forma dita variante, que se divide mais rapidamente, apresenta níveis elevados de expressão do proto-oncogene *c-myc* e é refractária ao tratamento (Gazdar *et al.*, 1985). Uma das possíveis causas para a diferenciação da forma clássica na forma variante pode residir no próprio tratamento da primeira com quimioterapia (Brambilla *et al.*, 1991).

Foi previamente demonstrado que nas linhas celulares clássicas de cancro humano de pequenas células do pulmão, mediante a ligação dos factores de crescimento aos receptores celulares, ocorre o aumento de Ca^{2+} intracelular, enquanto que a maioria das linhas celulares variantes (incluindo a linha celular H82) não apresentam, nestas condições, qualquer aumento do Ca^{2+} intracelular (Bunn *et al.*, 1992; Fay *et al.*, 1994). Uma das hipóteses formuladas para justificar este facto foi a ausência de receptores celulares para os factores de crescimento mitogénicos, nas linhas celulares variantes (Bunn *et al.*, 1992). Todavia, a presença destes receptores constitui um dos requisitos fundamentais necessários ao desenvolvimento de uma estratégia de vectorização de lipossomas mediada por ligandos como aquela que é proposta neste trabalho.

Neste estudo os resultados são consistentes com o facto do acoplamento covalente do antagonista G na extremidade das cadeias de PEG incorporadas à superfície de lipossomas, promover a internalização dos lipossomas pela linha celular variante de cancro humano de

pequenas células do pulmão, H82, num processo mediado por receptores. Daqui resulta uma evidente melhoria da cedência intracelular e citotoxicidade da DXR encapsulada, relativamente à formulação lipossômica de DXR não vectorizada.

A diferença de associação celular dos [³H]CHE-SLG nas experiências realizadas a 4 e a 37°C (Figura 3.1.) sugere que os lipossomas vectorizados pelo antagonista G são internalizados pelas células H82. Nestas condições, considerando que existem $7,7 \times 10^{12}$ lipossomas/ μ mol de fosfolípido (Lopes de Menezes *et al.*, 1998), pode estimar-se que, decorrida 1 h de incubação e para o intervalo de valores de concentração de fosfolípido testado, são internalizados entre 3600 a 12000 lipossomas/célula. A inibição competitiva da associação celular dos [³H]CHE-SLG foi apenas alcançada quando a pré-incubação se realizou com SLG (não marcados radioactivamente) e para quantidades de peptídeo cerca de 48 vezes inferior às de antagonista G livre utilizadas (Figura 3.2.). Este resultado confirmou que a internalização celular dos SLG teve lugar através de um processo mediado por receptores, envolvendo, possivelmente, locais de ligação multivalentes. A imobilização do antagonista G na extremidade das cadeias de PEG parece ter aumentado a avidéz dos lipossomas vectorizados para os receptores celulares, devido à apresentação multivalente do peptídeo. A avidéz corresponde à força total da ligação entre lipossoma e receptor estabelecida através de mais do que um local de ligação (Alberts *et al.*, 1983c).

O aumento dos níveis de associação celular dos SLG relativamente aos SL ou aos SLP(1-9), resultou num aumento da eficácia da cedência intracelular da DXR quando veiculada pelos SLG, tanto ao nível da fracção celular total como da fracção nuclear (respectivamente, Figuras 3.4.A e B). Nos estudos de associação celular de DXR observou-se que a estabilização da acumulação do fármaco na fracção nuclear ocorreu cerca de 6 h mais tarde do que na fracção celular total, e que poderá corresponder à fase de libertação da DXR a partir dos endossomas/lisossomas e posterior chegada ao núcleo. Em rigor, a forma como esta fase de libertação da DXR a partir dos endossomas/lisossomas (que necessariamente afectará a velocidade de chegada do fármaco aos locais de acção intracelulares) influencia a citotoxicidade das formulações vectorizadas por ligandos permanece ainda por ser avaliada.

Todavia, é de registar que no estudo apresentado neste capítulo foi observado que, independentemente do tempo necessário à libertação da DXR a partir dos endossomas/lisossomas, a formulação lipossómica vectorizada de DXR apresentou uma actividade citotóxica semelhante à do fármaco livre.

Em suma, a partir dos resultados apresentados neste capítulo é possível inferir que a linha celular variante de cancro humano de pequenas células do pulmão, H82, apresenta receptores para o antagonista G funcionalmente activos, não tendo a sua expressão sido afectada pela diferenciação celular ocorrida entre a forma clássica e a forma variante. Estes resultados, a par da elevada afinidade do antagonista G para o receptor da vasopressina (Woll e Rozengurt, 1990), que é aliás expresso à superfície das células variantes de cancro humano de pequenas células do pulmão (Fay *et al.*, 1994; North *et al.*, 1997; North *et al.*, 1998), sugerem que este possa ser o principal receptor envolvido na internalização celular dos SLG. Em adição, as pequenas diferenças observadas entre a linha celular variante H82 e a linha celular clássica H69 (capítulo 2), em termos da quantidade de antagonista G acoplado a lipossomas necessária para inibir 50% da associação celular dos [³H]CHE-SLG, sugerem que a densidade de receptores para o antagonista G é semelhante, em ambos os subtipos de cancro humano de pequenas células do pulmão. Esta ideia é aliás reforçada pelos padrões de associação celular semelhantes obtidos com lipossomas marcados radioactivamente (com [³H]CHE) ou fluorescentemente (com HPTS) ou com lipossomas contendo DXR.

Os resultados apresentados neste capítulo evidenciam mais uma vez, à semelhança daqueles apresentados no capítulo anterior, o potencial dos lipossomas vectorizados pelo antagonista G e contendo DXR no tratamento de doença tão agressiva e heterogénea como é o cancro humano de pequenas células do pulmão.



*Tese de Doutoramento
Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra
2001*

CAPÍTULO 4

**Inserção de conjugados de antagonista G-PEG-
DSPE em lipossomas pré-formados**

RESUMO

A aplicação clínica das formulações lipossômicas vectorizadas por ligandos depende, em parte, do desenvolvimento de técnicas de preparação mais simples e que permitam a sua produção em larga escala. Neste estudo foi testada a aplicabilidade de uma tecnologia recentemente desenvolvida na inserção de conjugados de antagonista G-PEG-DSPE em lipossomas com PEG pré-formados. Em concreto, avaliou-se a associação celular e a citotoxicidade dos lipossomas vectorizados pelo antagonista G preparados desta forma (PLG) e contendo DXR, contra a linha celular clássica de cancro humano de pequenas células do pulmão, H69. O antagonista G foi primeiramente acoplado covalentemente, através de uma ligação tioéter, à extremidade das cadeias de PEG derivatizadas com o fosfolípido DSPE e organizadas sob a forma de micelas. Seguidamente, procedeu-se à transferência, num único passo, dos conjugados de antagonista G-PEG-DSPE da fase micelar para os lipossomas pré-formados. Esta tecnologia de preparação de lipossomas vectorizados conduziu à obtenção de PLG com cerca de 0,3 µg de antagonista G/µmol de fosfolípido. Os lipossomas assim obtidos apresentaram um aumento significativo da associação celular relativamente aos lipossomas não vectorizados e, quando contendo DXR, apresentaram níveis de citotoxicidade semelhantes aos apresentados pelos lipossomas vectorizados pelo antagonista G e preparados pelas técnicas de acoplamento ditas convencionais (SLG). A técnica de pós-inserção revelou-se uma forma simples de preparar lipossomas vectorizados por peptídeos biologicamente activos, como o antagonista G.

4.1. INTRODUÇÃO

A preparação de lipossomas vectorizados com ligandos específicos de acordo com as metodologias apresentadas na secção 1.4.2., envolvem várias etapas de preparação e um razoável consumo de tempo. Em adição, têm também a desvantagem de uma parte dos grupos reactivos existentes na extremidade das cadeias de PEG ficar posicionada no interior dos lipossomas, ao nível do espaço interno aquoso (Zalipsky *et al.*, 1997), podendo, potencialmente, interagir com os compostos encapsulados. Assim, a aplicação clínica das formulações lipossómicas vectorizadas por ligandos depende, em parte, do desenvolvimento de técnicas de preparação mais simples e que permitam a produção em larga escala.

Uster *et al.* (1996), demonstraram que conjugados de PEG-DSPE podem ser rapidamente transferidos de uma fase micelar para a monocamada externa de lipossomas pré-formados e sem PEG, num processo que se revelou ser dependente do tempo e da temperatura. É de salientar que os lipossomas obtidos desta forma apresentam tempos de circulação sanguínea prolongados. Os valores máximos de inserção dos conjugados de PEG-DSPE nos lipossomas pré-formados foram obtidos para tempos de incubação de 1 h à temperatura de 60°C (Uster *et al.*, 1996). A aplicação desta tecnologia à preparação de lipossomas vectorizados por ligandos tem por objectivo, em última instância, que a sua preparação seja feita pelo próprio técnico de saúde responsável pela administração da quimioterapia. Com base no exame rigoroso do tecido tumoral específico relativo a um dado doente, é determinado o tipo de receptor no tumor que está expresso em maior densidade (e que seja específico do tumor) e é feita uma escolha criteriosa do fármaco mais adequado ao tratamento. Na posse destes dados e mediante a disponibilidade, por um lado, de uma gama variada de ligandos (acoplados a conjugados de PEG-DSPE) sob a forma micelar e, por outro lado, de uma gama variada de lipossomas contendo diferentes fármacos, é possível ao técnico de saúde preparar combinações múltiplas de sistemas lipossómicos vectorizados por ligandos e segundo as necessidades específicas de cada doente, de acordo com o diagrama apresentado na Figura 4.1.. Neste trabalho, esta tecnologia será designada por *técnica de pós-inserção*, uma vez que a incorporação do conjugado ligando-PEG-DSPE ocorre após a

formação dos lipossomas. Nas estratégias de acoplamento apresentadas na secção 1.4.2. e utilizadas experimentalmente no trabalho apresentado nos capítulos 2 e 3 ou na primeira parte da secção 4.2.4. do presente capítulo, a incorporação do conjugado PDP (ou MAL)-PEG-DSPE efectua-se aquando da mistura dos componentes lipídicos, em fase orgânica, antes das fases de hidratação e formação dos lipossomas. Estas técnicas de acoplamento serão designadas por *métodos de acoplamento convencionais*.

A preparação de lipossomas vectorizados por ligandos por recurso à técnica de pós-inserção foi já aplicada na preparação de lipossomas vectorizados com peptídeos (Zalipsky *et al.*, 1997), com oligossacarídeos (Zalipsky *et al.*, 1997) ou com anticorpos monoclonais (Ishida *et al.*, 1999). Nestes dois últimos casos, a transferência dos conjugados dos respectivos ligandos foi efectuada para lipossomas pré-formados e constituídos à partida por PEG. Ishida *et al.* (1999) observou que a inserção de conjugados de anticorpo monoclonal anti-CD19-PEG-DSPE, resultou na obtenção de lipossomas vectorizados cuja associação com as células Namalwa (CD19+) foi cerca de 3 vezes superior à associação celular dos lipossomas não vectorizados. Este resultado foi aliás semelhante ao obtido com os lipossomas vectorizados com o mesmo anticorpo monoclonal e preparados pelas metodologias de acoplamento convencionais, em particular pelo método de acoplamento que envolve a utilização de hidrazida-PEG-DSPE (Lopes de Menezes *et al.*, 1998).

No estudo apresentado no presente capítulo avaliou-se a aplicabilidade da técnica de pós-inserção na preparação de lipossomas vectorizados pelo antagonista G. Foi dado especial ênfase à associação celular e à citotoxicidade dos lipossomas preparados desta forma, e contendo DXR, contra a linha celular H69.

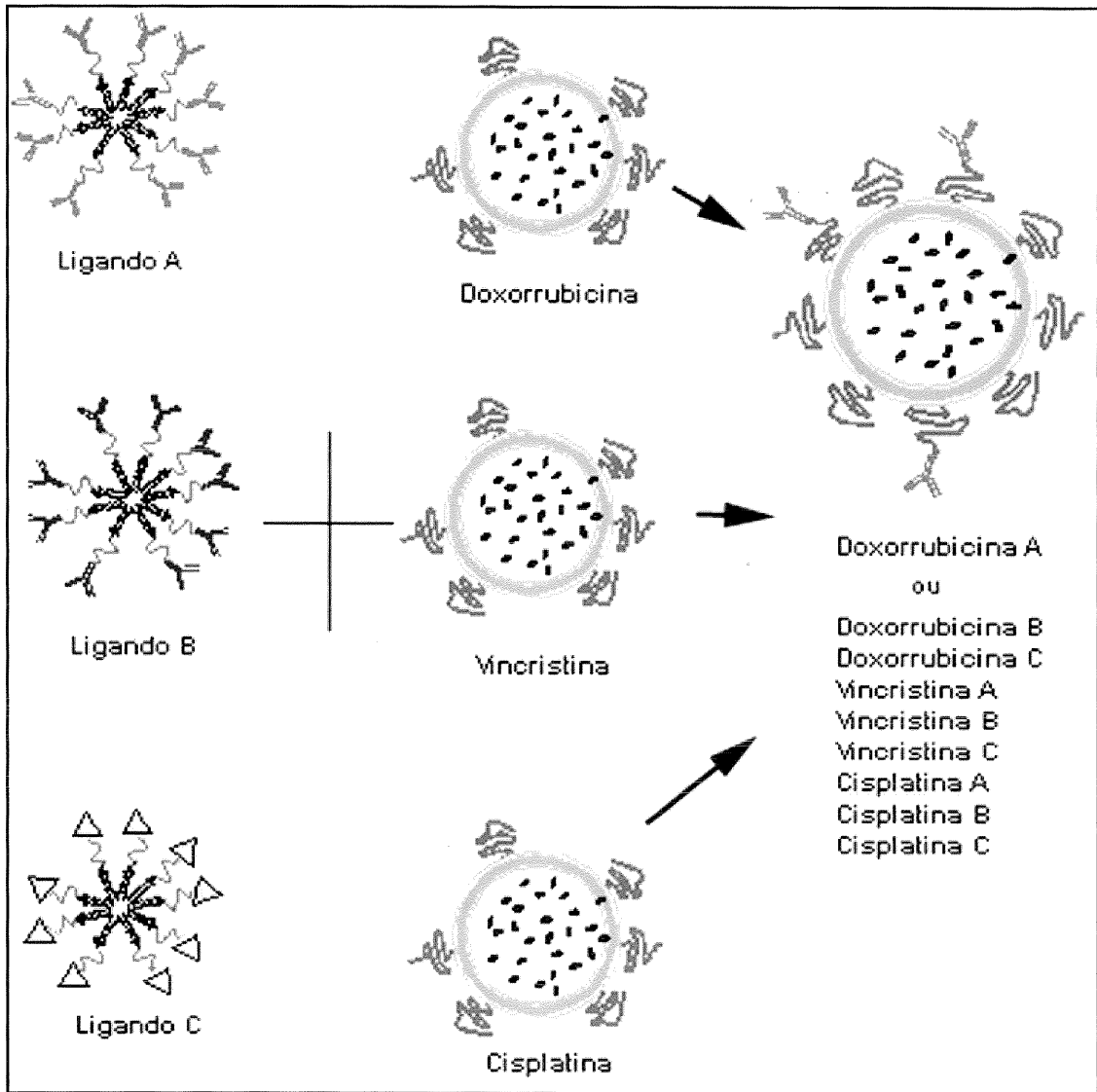


Figura 4.1. - Representação esquemática da técnica de pós-inserção na preparação de lipossomas estabilizados estereamente com PEG e vectorizados por ligandos. Mediante determinadas condições experimentais é possível transferir conjugados de ligandos-PEG-DSPE existentes sob a forma de micelas para o folheto externo de lipossomas pré-formados. Esta técnica tem a vantagem de simplificar e tornar versátil a preparação de lipossomas vectorizados por ligandos. Desta forma é possível preparar combinações múltiplas de sistemas lipossômicos vectorizados por ligandos e segundo as necessidades específicas de cada doente (adaptado de Ishida *et al.*, 1999).

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Reagentes

O 2-iminotiolano e o 2-mercaptoetanol foram adquiridos à Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). O conjugado PEG-DSPE derivatizado com um grupo maleiamida na extremidade da cadeia de PEG (MAL-PEG-DSPE) foi adquirido à Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, AL). A origem dos restantes reagentes utilizados neste estudo foi já referida de forma detalhada na secção 2.2.1..

4.2.2. Células em cultura

A origem e as condições de cultura das células H69 utilizadas neste estudo foram abordadas anteriormente na secção 2.2.2..

4.2.3. Preparação de lipossomas

Os lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08, com ou sem 1 mol% de MAL-PEG-DSPE (correspondente a um total de derivado lipídico de PEG de 5 mol% do conteúdo total do fosfolípido, HSPC), foram preparados por hidratação de um filme lipídico à temperatura de 65°C (perfazendo uma concentração de fosfolípido de 10 ou 20 mM). Os lipossomas multilamelares resultantes foram depois submetidos a extrusão, com o intuito de se obterem lipossomas unilamelares com um diâmetro médio aproximado de 100 nm (secção 2.2.3.; Olson *et al.*, 1979).

A preparação de lipossomas de DXR foi realizada por encapsulação remota, utilizando um gradiente de sulfato de amónio (Bolotin *et al.*, 1994) e descrita de forma detalhada na secção 2.2.3.. A quantificação de fosfolípido foi efectuada pelo método colorimétrico de Bartlett (Bartlett, 1959) ou por recurso à actividade específica inicial dos

lipossomas marcados com [³H]CHE, segundo o referido na secção 2.2.5..

4.2.4. Preparação de lipossomas vectorizados pelo método de acoplamento convencional ou pelo método de pós-inserção

Antes de passar ao desenvolvimento do título referente a esta secção, há que chamar a atenção para o facto da metodologia de acoplamento a utilizar neste estudo ser diferente da referida nos capítulos 2 e 3. A nova metodologia de acoplamento envolve também a formação de uma ligação tioéter entre o antagonista G e as cadeias de PEG. Porém, o grupo maleiamida está originalmente presente na extremidade das cadeias de PEG enquanto que o grupo tiol é introduzido no antagonista G, de acordo com a metodologia que se descreve no parágrafo seguinte. A razão desta alteração deve-se ao facto de, no decorrer dos estudos *in vivo* (capítulo 5), se ter observado que o tamanho dos SLG preparados pelo método de acoplamento PDP-PEG-DSPE era suficientemente elevado para comprometer a acumulação tumoral destes lipossomas. Como se poderá observar na sequência dos resultados apresentados no capítulo 5, este problema foi ultrapassado com a utilização da metodologia de acoplamento MAL-PEG-DSPE, que se descreve no parágrafo seguinte. Como será demonstrado no capítulo 5, para as mesmas quantidades de antagonista G acopladas por um e por outro método de acoplamento, os níveis de associação celular permanecem inalterados.

Os derivados tiolados do antagonista G foram obtidos por reacção do peptídeo com 2-iminotiolano durante 1 h à temperatura ambiente, numa razão molar antagonista G/2-iminotiolano de 1:4 e numa solução tampão constituída por HEPES 25 mM e NaCl 140 mM, a pH 8,0 (Hermanson, 1996a). Este derivado do antagonista G foi depois adicionado aos grupos reactivos de maleiamida existentes na extremidade do PEG lipossómico (numa razão molar antagonista G/fosfolípido de 1:100), tendo a reacção decorrido a pH 6,5 (HEPES 25 mM, MES 25 mM e NaCl 140 mM) durante 14 a 18 h, à temperatura ambiente e em atmosfera de gás inerte, N₂ (Martin e Papahadjopoulos, 1982). Após este período de tempo, e com o objectivo de bloquear os grupos maleiamida que não tenham reagido com o

antagonista G, adicionou-se 2-mercaptoetanol numa concentração cinco vezes superior à concentração de grupos maleiamida presentes no meio reaccional. Esta reacção decorreu durante 30 min à temperatura ambiente. De outra forma, os grupos maleiamida livres poderiam determinar a ocorrência de interacções não específicas entre os lipossomas e componentes celulares ou plasmáticos. As reacções de activação do antagonista G e posterior acoplamento aos lipossomas decorreram em frascos de vidro revestidos com silicone (Sigmacote[®], Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Estes frascos foram revestidos com o referido produto de acordo com o protocolo descrito na secção 2.2.4..

Finalmente, os lipossomas foram submetidos a cromatografia de exclusão molecular por passagem em coluna de Sepharose CL-4B, equilibrada numa solução tampão fisiológica de HEPES a pH 7,4.

No que diz respeito à preparação de lipossomas vectorizados pelo antagonista G pelo método de pós-inserção, numa primeira fase procedeu-se à hidratação com solução tampão HEPES a pH 6,5 (HEPES 25 mM, MES 25 mM e NaCl 140 mM), à temperatura de 65°C e mediante agitação, de filmes lipídicos constituídos apenas por MAL-PEG-DSPE, de modo a obter uma concentração de lípido de 0,333 mM. A activação e o acoplamento do antagonista G às micelas obtidas no passo anterior processou-se nas mesmas condições experimentais referidas na parte inicial desta secção, respeitante à preparação de SLG pelo método de acoplamento que envolve a utilização de MAL-PEG-DSPE. Após a reacção de acoplamento, as micelas foram concentradas em tubos Centrisart I[®] (Sartorius AG, Goettingen; o diâmetro do poro da membrana de diálise proporciona a exclusão de compostos com um peso molecular inferior a 5000 D) e depois, no caso das experiências que envolviam a utilização de DXR, submetidas a diálise (Pierce Slide-A-Lyzer dialysis cassettes No. 66425, Pierce, Rockford, IL) contra 800 ml de uma solução de sulfato de amónio a 250 mM (pH 5,5), à temperatura de 4 °C mediante agitação suave e durante 12 a 18 h (o diâmetro do poro da membrana de diálise proporciona a exclusão de compostos com um peso molecular inferior a 10000 D).

Com o objectivo de preparar os PLG, diversas proporções de micelas formadas pelos conjugados de antagonista G-PEG-DSPE (1, 2 ou 4 mol% relativamente ao fosfolípido lipossómico) foram incubadas com lipossomas pré-formados durante 1 h a 60°C. Os lipossomas foram depois submetidos a cromatografia de exclusão molecular por passagem em coluna de Sepharose CL-4B, equilibrada na solução tampão de HEPES a pH 7,4 ou, no caso das experiências com DXR, na solução tampão formada por acetato de sódio (100 mM) e NaCl (70 mM) a pH 5,5. Neste último caso, os lipossomas foram posteriormente submetidos a nova passagem por coluna de Sephadex G-50 equilibrada na solução tampão de HEPES a pH 7,4.

Independentemente do método de preparação, a quantificação do antagonista G foi realizada por fluorimetria nas condições mencionadas na secção 2.2.4..

4.2.5. Associação celular de lipossomas

Nos estudos de associação celular, SL, PLG ou SLG, marcados radioactivamente com [³H]CHE, foram incubados com 1×10^6 células H69, durante 1 h à temperatura de 37°C, de acordo com o protocolo descrito na secção 2.2.6.. A quantidade final de lipossomas associada às células foi calculada a partir da actividade específica inicial dos lipossomas marcados com [³H]CHE, de acordo com o referido na secção 2.2.5.. Os resultados de associação celular foram expressos em termos de nmol de fosfolípido/ 10^6 células.

4.2.6. Libertação *in vitro* de doxorrubicina a partir de lipossomas

Com base no princípio e nas condições descritas anteriormente na secção 3.2.7., a libertação de DXR lipossómica foi avaliada a partir das seguintes amostras: DXR-SL, DXR-SLG e DXR-PLG (Gaber *et al.*, 1995). A percentagem de libertação da DXR foi calculada a partir da equação 3.1. (Gaber *et al.*, 1995).

4.2.7. Citotoxicidade

A citotoxicidade dos lipossomas vectorizados pelo antagonista G, preparados pelo método de pós-inserção ou pelo método de acoplamento dito convencional (MAL-PEG-DSPE), foi testada por recurso ao método do MTT (Mosmann, 1983) contra a linha celular H69, de acordo com a metodologia descrita na secção 2.2.8.. Os resultados foram expressos em termos de IC₅₀ (µM de DXR), determinados a partir de curvas dose-resposta.

4.2.8. Análise estatística

A diferença estatística entre pares de resultados foi avaliada através do teste t de student. Tal como mencionado nos capítulos 2 (secção 2.2.10) e 3 (secção 3.2.8.), também no presente capítulo as diferenças entre os resultados foram consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tal como descrito no trabalho apresentado no capítulo 5, a preparação de lipossomas vectorizados pelo antagonista G pelo método de acoplamento convencional que envolve a utilização de MAL-PEG-DSPE, traduz-se no acoplamento de 1 µg de antagonista G/µmol de fosfolípido. No estudo desenvolvido no presente capítulo, avaliou-se a aplicabilidade da tecnologia de pós-inserção na preparação de lipossomas vectorizados pelo antagonista G.

A incubação de lipossomas formados por 4 mol% de PEG-DSPE (relativamente ao fosfolípido) com 1, 2 ou 4 mol% de micelas constituídas por conjugados de antagonista G-PEG-DSPE, resultou na inserção na preparação final de lipossomas de, respectivamente, $0,15 \pm 0,02$, $0,33 \pm 0,08$ e $0,34 \pm 0,15$ μg de antagonista G/ μmol de fosfolípido. Como esperado, a associação celular destas formulações aumentou em função da quantidade de peptídeo inserido nos lipossomas pré-formados (Figura 4.2.). Para níveis de incorporação compreendidos entre 0,15 e 0,34 μg de antagonista G/ μmol de fosfolípido, a associação celular máxima dos PLG (entre 1 e 1,8 nmol de fosfolípido/ 10^6 células) foi intermédia daquela observada para as preparações de SLG contendo 0,3 ou 1 μg de antagonista G/ μmol de fosfolípido (e que correspondem, respectivamente, a associações celulares máximas de 0,8 e 2,8 nmol de fosfolípido/ 10^6 células; Figura 4.2.). Estes resultados sugerem que para uma quantidade equivalente de antagonista G acoplada, os PLG apresentam uma associação

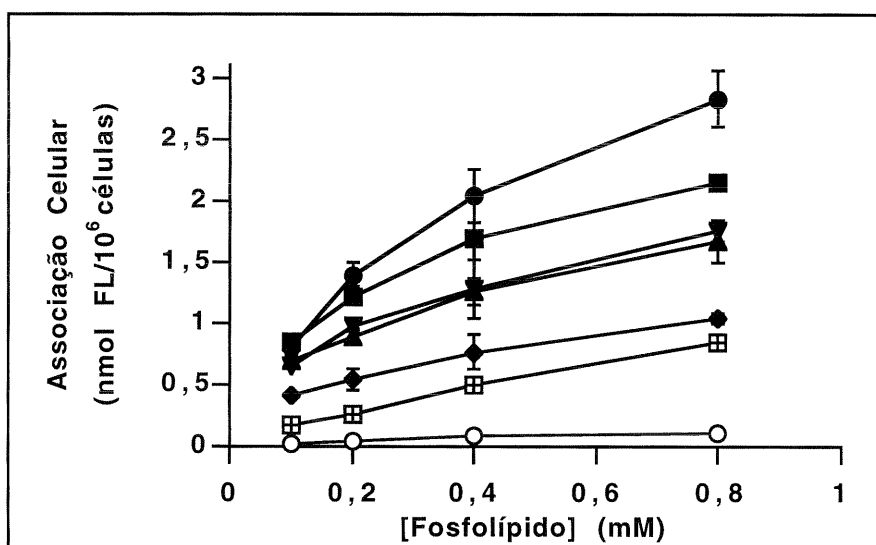


Figura 4.2. - Associação celular de várias formulações de lipossomas, marcados radioactivamente com [^3H]CHE, com as células H69. Os lipossomas foram incubados com 1×10^6 células H69 durante 1 h a 37°C , em concentrações de fosfolípido que variaram entre 0,1 e 0,8 mM/poço. As amostras testadas foram as seguintes: lipossomas não vectorizados (—○—); lipossomas vectorizados preparados pelo método de pós-inserção e contendo 0,15 (—◇—), 0,33 (—▲—) ou 0,34 (—▼—) μg de antagonista G/ μmol de fosfolípido; lipossomas vectorizados preparados pelo método convencional e contendo 0,3 (—□—) ou 1 μg (—●—, —■—) de antagonista G/ μmol de fosfolípido, em que uma das amostras (—■—) foi concentrada e aquecida durante 1 h a 60°C . Terminado o ensaio, as células foram submetidas a um processo de lavagem a 4°C com PBS. A quantidade de lipossomas associados às células foi determinada por contagem de cintilações e a associação celular dos lipossomas foi calculada a partir da actividade específica inicial dos lipossomas marcados com [^3H]CHE. Os resultados foram expressos em termos de nmol de fosfolípido/ 1×10^6 células. Os resultados são a média de 3 amostras, \pm desvios padrão, obtidos a partir de uma experiência representativa.

celular superior à dos SLG. Na base deste resultado poderá estar o facto de no acoplamento do peptídeo pelo método convencional, devido à sua hidrofobicidade e reduzidas dimensões moleculares, ocorrer um certo nível de associação não específica de antagonista G com a membrana lipossómica, não participando, pois, no processo de associação celular dos SLG. No caso dos lipossomas vectorizados preparados pelo método de pós-inserção, a inserção dos conjugados antagonista G-PEG-DSPE de maiores dimensões nos lipossomas pré-formados, diminui de forma acentuada, ou elimina de todo, a associação não específica do peptídeo aos lipossomas pré-formados.

Seguidamente, procurou-se esclarecer se a etapa de aquecimento utilizada durante a transferência dos conjugados de antagonista G-PEG-DSPE afectaria a associação celular da preparação final de lipossomas. Para o efeito, procedeu-se à concentração (nas mesmas condições empregues na preparação dos PLG) e aquecimento durante 1 h a 60°C, de uma preparação de SLG constituída por 1 µg de antagonista G/µmol de fosfolípido. Desta experiência resultou apenas uma ligeira diminuição da associação celular relativamente aos SLG não submetidos àquelas condições (Figura 4.2.). Este dado sugere que o antagonista G é relativamente estável à concentração e, sobretudo, ao aquecimento naquelas condições, permanecendo deste modo funcionalmente activo.

Atendendo a que a transferência dos conjugados de antagonista G-PEG-DSPE para os lipossomas pré-formados tem lugar a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase da HSPC, avaliou-se a estabilidade física dos lipossomas com DXR quando submetidos a este tipo de metodologia. Observou-se que a incubação de lipossomas contendo DXR, e formados por 4 mol% de PEG-DSPE, com 2 mol% (relativamente ao fosfolípido lipossómico) de micelas de antagonista G-PEG-DSPE durante 1 h a 60°C, resulta numa libertação de DXR de 87%. É de registar que, nas mesmas condições experimentais, o aumento para 9 mol% da quantidade de PEG-DSPE incorporado nos lipossomas pré-formados, não evitou uma libertação de DXR de 60%.

De referir que Ishida *et al.* (1999) não observaram uma libertação significativa quando lipossomas de DXR foram submetidos a um aquecimento de 6 h a 60°C, na presença ou ausência de micelas formadas por conjugados de imunoglobulina G-PEG-DSPE. Este resultado sugere que o conjugado antagonista G-PEG-DSPE pode causar uma perturbação da membrana lipossômica, que poderá ser permanente ou apenas transitória, no momento da sua inserção na bicamada. Com o intuito de elucidar este aspecto, realizaram-se estudos de libertação de DXR a 37°C, na sequência da incubação de várias preparações de lipossomas (SL, PLG e SLG) em diferentes meios (Figura 4.3.). Decorridas 36 h à temperatura de 37°C, independentemente do meio de incubação e do método de preparação (SLG ou PLG), a libertação de DXR foi aproximadamente a mesma da observada para os lipossomas não vectorizados. Estes dados sugerem que a perturbação na membrana lipossômica que ocorre durante a inserção de conjugados de antagonista G-PEG-DSPE tem carácter transitório. Com o completar do processo de inserção, a localização do peptídeo alguns nanómetros para além da superfície da membrana lipossômica previne qualquer processo posterior de desestabilização membranar.

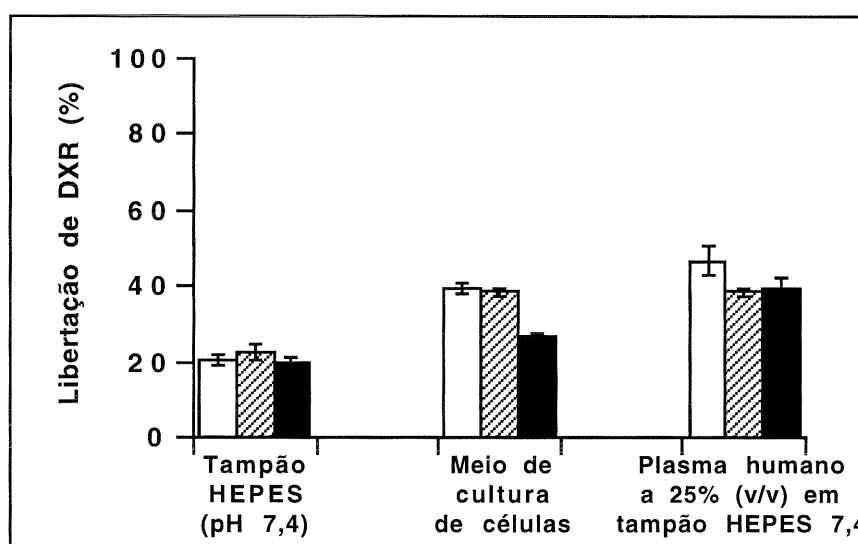


Figura 4.3. - Libertação *in vitro* de DXR a partir de lipossomas em diferentes meios e após incubação durante 36 h a 37°C. A libertação de DXR a partir de DXR-SL (□), DXR-PLG (▨) e de DXR-SLG (■) foi determinada a 37°C e sob agitação suave, em solução tampão HEPES a pH 7,4, em meio de cultura de células (meio de cultura RPMI 1640, enriquecido com FBS a 10%, v/v, previamente inactivado) ou em plasma humano (a 25%, v/v, em solução tampão HEPES a pH 7,4). Os resultados foram expressos em termos da percentagem de libertação da DXR encapsulada de acordo com o descrito na secção 3.2.7. e são a média de 3 a 6 amostras, ± desvios padrão, obtidos a partir de uma experiência representativa.

Assim, no presente estudo, nas experiências em que foi necessária a preparação de PLG contendo DXR, a encapsulação do fármaco foi realizada após a transferência dos conjugados antagonista G-PEG-DSPE.

O tamanho dos lipossomas é um parâmetro crítico no que diz respeito à sua aplicação *in vivo*. Idealmente, os lipossomas devem possuir um diâmetro médio aproximado de 100 nm de forma, por um lado, a minimizar a acumulação no fígado e no baço (Litzinger *et al.*, 1994) e, por outro lado, a assegurar a acumulação em locais onde é necessária uma acção terapêutica como é o caso dos tumores sólidos (Papahadjopoulos *et al.*, 1991; Gabizon *et al.*, 1994). Neste contexto, procedeu-se à determinação do diâmetro médio dos lipossomas, antes e depois da inserção dos conjugados de antagonista G-PEG-DSPE, tendo-se verificado aumentos de tamanhos de apenas 3 e 4 nm (o tamanho final variou entre 94 e 99 nm com um índice de polidispersão entre 0,06 e 0,10).

Na sequência da observação de que, para as mesmas quantidades finais de antagonista G (Figura 4.2.), a associação celular dos PLG é superior à dos SLG, avaliou-se a citotoxicidade relativa destas preparações, contendo DXR, contra a linha celular H69 (Figura 4.4.).

Para preparações lipossômicas constituídas por quantidades iguais de peptídeo (0,3 µg de antagonista G/µmol de fosfolípido), a DXR-PLG foi 18 vezes mais tóxica do que a DXR-SLG ($P < 0,001$), para um período de incubação de 2 h. A magnitude desta diferença diminuiu para tempos de incubação superiores, tendo-se todavia mantido estatisticamente significativa. Assim, ao fim de 24 e 48 h a citotoxicidade da DXR-PLG foi, respectivamente, 6 ($P < 0,001$) e 2 ($P < 0,01$) vezes superior à da DXR-SLG. É de salientar que, apesar da associação celular dos PLG formados por 0,3 µg de antagonista G/µmol de fosfolípido ser inferior à observada para os SLG com 1 µg de antagonista G/µmol de fosfolípido (Figura 4.2.), ambas as preparações apresentam níveis semelhantes de citotoxicidade (Figura 4.4. *versus* Tabela 2.1.).

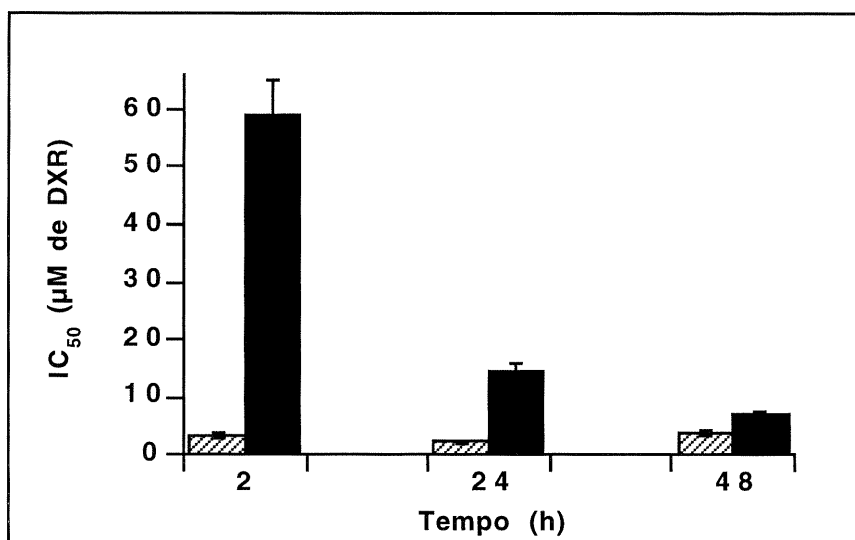


Figura 4.4. - Citotoxicidade (IC_{50}) de DXR-PLG versus DXR-SLG contra as células H69. As células H69 (8×10^4 /poço) foram incubadas com DXR-PLG (▨) ou com DXR-SLG (■), ambas contendo $0,3 \mu\text{g}$ de antagonista G/ μmol de fosfolípido, durante 2, 24 e 48 h. Decorridos estes períodos de incubação, as células foram lavadas e mantidas em meio de cultura fresco (sem tratamento) a 37°C e até perfazer 5 dias, desde o início do estudo. Os resultados, expressos em termos de IC_{50} (μM de DXR), são a média de 3 a 4 experiências independentes, \pm desvios padrão.

Estes dados suportam a hipótese de que o antagonista G nos PLG estará mais disponível para se ligar aos receptores das células tumorais. Outra hipótese que se poderá avançar, e que não exclui a anterior, é a possibilidade dos PLG serem internalizados de forma mais eficiente dos que os SLG. Esta última hipótese carece, porém, de confirmação experimental.

Por exemplo, na preparação dos SLG, concretamente durante o acoplamento, existe uma fracção de antagonista G que se poderá inserir na bicamada fosfolipídica através de interacções hidrofóbicas. Desta forma, esta fracção de peptídeo não participará na ligação covalente nas extremidades das cadeias de PEG e, conseqüentemente, não participará na ligação dos SLG às células tumorais.

De forma a determinar a fracção de antagonista G associado aos lipossomas de forma não específica, efectuou-se uma experiência controlo em que lipossomas contendo 5 mol% de PEG-DSPE (sem MAL-PEG-DSPE) foram incubados com antagonista G, nas mesmas condições experimentais daquelas utilizadas usualmente numa reacção de acoplamento (secção 4.2.4.). Depois de submeter esta preparação a uma cromatografia de exclusão

molecular (em coluna de Sepharose CL-4B), determinou-se uma quantidade de peptídeo associada não especificamente com os lipossomas que corresponde a 16% da quantidade de antagonista G associada aos lipossomas nos SLG.

Em suma, os presentes resultados demonstram que o antagonista G pode ser acoplado covalentemente a micelas constituídas por MAL-PEG-DSPE, de que resultam conjugados de peptídeo-PEG-DSPE que podem ser transferidos para lipossomas pré-formados num único passo, sem afectar significativamente o tamanho final dos lipossomas. Para quantidades semelhantes de antagonista G, os PLG apresentam níveis de associação celular superiores aos dos SLG, de que resulta uma maior citotoxicidade. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a utilização da tecnologia de pós-inserção na preparação de lipossomas vectorizados por ligandos pode constituir uma forma eficaz de limitar a absorção não específica de ligandos aos lipossomas, em particular, quando se trata de compostos hidrofóbicos. A extensão da técnica de pós-inserção para incorporar conjugados de antagonista G-PEG-DSPE confirma a flexibilidade desta estratégia na preparação de lipossomas vectorizados por ligandos.



Tese de Doutoramento
Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra
2001

CAPÍTULO 5

Vectorização *in vivo* de lipossomas estabilizados estereamente para o cancro humano de pequenas células do pulmão

RESUMO

Neste estudo avaliou-se a acumulação tumoral e a actividade terapêutica de lipossomas com PEG e contendo, respectivamente, [125 I]TI e DXR. Os modelos animais utilizados foram ratinhos atímicos *Balb/c nude* com tumores subcutâneos resultantes da inoculação (subcutânea) de células clássicas de cancro humano de pequenas células do pulmão (H69). Os estudos de biodistribuição demonstraram que, decorridas 48 e 72 h após administração intravenosa, a acumulação tumoral dos lipossomas revelou ser independente da presença do antagonista G. Os níveis máximos de acumulação tumoral, tanto para os SL como para os SLG (preparados pelo método de acoplamento que envolve a utilização de MAL-PEG-DSPE), variaram entre 2 e 4 % da dose injectada/g de tecido. Nos estudos terapêuticos, os animais, com volumes tumorais iniciais de 7 ou 33 mm³, foram tratados semanalmente (e durante 3 semanas) com 3 ou 6 mg de DXR livre/kg de peso corporal ou com 3 ou 10 mg de DXR lipossómica/kg de peso corporal. A eficácia terapêutica da DXR-SL ou da DXR-SLG, para as doses mais elevadas, foi significativamente superior à da DXR livre, no entanto, não se registaram quaisquer diferenças entre DXR-SL e DXR-SLG. Destes resultados, destaca-se, todavia, o potencial terapêutico dos lipossomas Stealth[®] contendo DXR contra o cancro humano de pequenas células do pulmão.

5.1. INTRODUÇÃO

Como referido na introdução geral desta dissertação, os lipossomas estabilizados estereamente com PEG e com diâmetros médios aproximados de 100 nm apresentam tempos de circulação sanguínea prolongados, de que resulta um aumento da acumulação tumoral dos correspondentes fármacos lipossómicos e a consequente melhoria da eficácia terapêutica relativamente à terapia com os respectivos fármacos livres (Papahadjopoulos *et al.*, 1991; Gabizon *et al.*, 1994; Northfelt *et al.*, 1996; Muggia *et al.*, 1997; Gordon *et al.*, 2000). Embora este tipo de resultados tenha constituído a base para a aprovação clínica dos lipossomas Stealth[®] contendo DXR no tratamento do Sarcoma de Kaposi (Northfelt *et al.*, 1996) e do cancro do ovário (Muggia *et al.*, 1997; Gordon *et al.*, 2000), a sua eficácia contra o cancro humano de pequenas células do pulmão permanece ainda por ser avaliada.

O desenvolvimento de estratégias para acoplar covalentemente ligandos susceptíveis de serem reconhecidos especificamente por receptores existentes à superfície de células tumorais, como os anticorpos monoclonais (Allen *et al.*, 1995b; Hansen *et al.*, 1995), na extremidade das cadeias hidrofílicas de PEG incorporado em lipossomas, tem revelado alguma eficácia na melhoria da actividade terapêutica da DXR em relação à forma lipossómica não vectorizada deste fármaco. Em concreto, refira-se o tratamento de tumores localizados ao nível do pulmão (Ahmad *et al.*, 1993; Sugano *et al.*, 2000; Moase *et al.*, 2001), do compartimento vascular (Lopes de Menezes *et al.*, 1998) ou da cavidade peritoneal (Lopes de Menezes *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1999). No caso do tratamento de tumores sólidos em fases avançadas de desenvolvimento, as formas lipossómicas de DXR vectorizadas por anticorpos monoclonais não têm demonstrado vantagens terapêuticas em relação às formas não vectorizadas (Allen *et al.*, 1995a; Moase *et al.*, 2001). Nestas condições, apenas no caso em que os lipossomas de DXR foram vectorizados com um fragmento de um anticorpo monoclonal para células de cancro da mama humano, se observou uma vantagem terapêutica relativamente aos lipossomas não vectorizados (Park *et al.*, 1997). Neste contexto e em face dos resultados apresentados nos capítulos anteriores, justifica-se efectuar a avaliação da actividade terapêutica dos lipossomas de DXR e

vectorizados pelo hexapeptídeo, antagonista G, contra o cancro humano de pequenas células do pulmão.

Assim, no trabalho desenvolvido neste capítulo avaliou-se a biodistribuição de lipossomas estabilizados estereamente com PEG, vectorizados ou não pelo antagonista G, em ratinhos atímicos *Balb/c nude*. Nestes, foram implantados tumores subcutâneos de cancro humano de pequenas células do pulmão e derivados da linha celular humana H69 (estes tumores serão designados por tumores subcutâneos H69). Utilizando este modelo animal, avaliou-se também a actividade terapêutica da DXR-SLG, comparativamente com a DXR-SL ou a DXR livre, no tratamento de tumores primários de cancro humano de pequenas células do pulmão.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Reagentes

A origem dos reagentes utilizados neste estudo foi referida de forma detalhada nas secções 2.2.1. e 4.2.1..

5.2.2. Linha celular

A origem e as condições de cultura das células H69 utilizadas neste estudo foi mencionada na secção 2.2.2..

5.2.3. Preparação de lipossomas

Nos estudos apresentados neste capítulo utilizaram-se lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE e PDP-PEG-DSPE ou MAL-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02. A preparação dos lipossomas (Olson *et al.*, 1979), com a correspondente

encapsulação de [¹²⁵I]TI (Allen *et al.*, 1993) ou de DXR (Bolotin *et al.*, 1994), foi realizada de acordo com a metodologia descrita na secção 2.2.3.. O acoplamento covalente do antagonista G aos lipossomas foi realizado distintamente, utilizando os lípidos PDP-PEG-DSPE (descrito na secção 2.2.4.) ou MAL-PEG-DSPE (descrito na secção 4.2.4.).

A quantificação de fosfolípido foi realizada pelo método colorimétrico de Bartlett (Bartlett, 1959) ou por recurso à actividade específica inicial dos lipossomas marcados com [³H]CHE, segundo o referido na secção 2.2.5..

5.2.4. Desenvolvimento de tumores subcutâneos

No desenvolvimento do modelo animal de cancro humano de pequenas células do pulmão foram utilizados ratinhos atímicos fêmeas *Balb/c nude* com 4 a 5 semanas de idade e adquiridos à Charles Rivers Canada (St. Constant, PQ). Os animais foram mantidos no biotério da Universidade de Alberta (*Health Sciences Laboratory Animal Services*), na unidade destinada aos animais imunodeprimidos, tendo-lhes sido fornecido água e alimentos autoclavados. Após chegada ao biotério, foi concedido aos animais um período mínimo de aclimação de 1 semana. Todos os protocolos de ensaios com animais foram aprovados pelo *Health Sciences Animal Policy and Welfare Committee* da Universidade de Alberta e de acordo com o *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, publicado pelo *Canadian Council on Animal Care*.

Os tumores subcutâneos H69 foram originalmente obtidos a partir da administração subcutânea na coxa dos ratinhos atímicos de 10⁷ células H69 em fase de crescimento exponencial (num volume de 0,1 ml em PBS). Decorridas 4 a 6 semanas desenvolveram-se tumores subcutâneos, os quais foram posteriormente mantidos como tal, ao longo de várias passagens (gerações), nas coxas daquela espécie de animais. Para este efeito, procedeu-se, primeiramente, à dissecação asséptica dos tumores a partir de animais previamente anestesiados com metoxiflurano (Metofane, Janssen Pharmaceutica, Toronto, ON) e sacrificados por deslocamento cervical. Seguidamente e após remoção da massa tumoral necrosada, os tumores foram mecanicamente cortados em solução de PBS estéril adicionada

de 0,1% de glucose. O tecido tumoral com cerca de 2-3 mm³ foi depois implantado subcutaneamente através de uma agulha *trochar* na coxa de ratinhos previamente anestesiados com metoxiflurano. Os tumores subcutâneos utilizados nos estudos apresentados neste capítulo foram propagados deste modo entre 4 e 11 vezes (4 e 11 gerações). A análise histológica em cada passagem, confirmou a patologia de cancro humano de pequenas células do pulmão do tecido tumoral.

5.2.5. Desenvolvimento de modelo intravenoso de cancro humano de pequenas células do pulmão em ratinhos com a imunodeficiência severa combinada (SCID)

Com base em trabalho previamente publicado (Kuo *et al.*, 1992; Kuo *et al.*, 1993), realizaram-se várias tentativas para desenvolver um modelo intravenoso do cancro humano de pequenas células do pulmão. Para o efeito, utilizaram-se ratinhos *SCID CB17*, os quais apresentam um maior grau de imunodepressão do que os ratinhos *Balb/c nude* (mantidos em condições idênticas às referidas para os ratinhos *Balb/c nude*). Cinco milhões de células H69, desenvolvidas em cultura ou colhidas a partir de tumores subcutâneos H69 desenvolvidos em ratinhos atímicos *Balb/c nude*, foram injectadas por via intravenosa, através da veia da cauda. A análise histológica revelou, no entanto, que nestas condições as células tumorais não se alojam nem nos pulmões nem em qualquer outro órgão. Este facto impediu a utilização deste modelo animal nos estudos realizados.

Embora os ratinhos *SCID CB17* não produzam células B e T funcionais, a presença de células NK (*natural killer cells*; células semelhantes a linfócitos que de forma espontânea e relativamente não específica atacam células estranhas ao organismo; Alberts *et al.*, 1983b) parecem desempenhar um papel importante na erradicação das células tumorais circulantes (Hanna, 1985; Mueller e Reisfeld, 1991).

5.2.6. Biodistribuição de lipossomas em ratinhos com tumores subcutâneos

Os estudos de biodistribuição em ratinhos atímicos *Balb/c nude* com tumores subcutâneos H69 foram realizados com SLG (preparados pelos métodos de acoplamento PDP-PEG-DSPE e MAL-PEG-DSPE) e SL, utilizando a [¹²⁵I]TI como marcador radioactivo do espaço aquoso dos lipossomas (Allen *et al.*, 1993) de acordo com a metodologia descrita na secção 2.2.9.. Neste estudo foram utilizados animais que, à data de início deste estudo, apresentavam tumores com um volume médio de 43 mm³. Com o intuito de comparar os resultados obtidos com os publicados por outros autores, os resultados foram expressos em termos da percentagem de dose injectada/g de tecido.

5.2.7. Associação celular

Nos estudos de associação celular, SL ou SLG (preparados pelos métodos de acoplamento que envolvem a utilização de PDP-PEG-DSPE e de MAL-PEG-DSPE), marcados radioactivamente com [³H]CHE, foram incubados com 1x10⁶ células H69, desenvolvidas em cultura ou colhidas a partir de tumores subcutâneos H69, durante 1 h à temperatura de 37°C, de acordo com o protocolo descrito na secção 2.2.6..

A remoção dos tumores subcutâneos H69 (após 4 e 11 gerações) foi realizada assepticamente, a partir dos animais previamente anestesiados com Halotano[®] e sacrificados por deslocamento cervical. Com o objectivo de desagregar as células a partir do tumor, a massa tumoral viável foi cortada mecanicamente com um bisturi, em solução tampão de PBS estéril adicionada de 0,1% de glucose. De forma a desfazer tão eficazmente quanto possível os pequenos agregados celulares (ou de massa tumoral), efectuou-se a sua passagem em filtro adequado para este efeito (Cell strainer, 70 µm nylon, Falcon, Becton Dickinson, NJ) para um tubo de 50 ml (Falcon, Becton Dickinson, NJ). A suspensão celular foi depois centrifugada a 1540 g durante 10 min e depois ressuspensa em meio de cultura de células de modo a perfazer 1x10⁷ células/ml.

A quantidade final de lipossomas associada às células foi calculada a partir da actividade específica inicial dos lipossomas marcados com [³H]CHE, de acordo com o referido na secção 2.2.5.. Os resultados de associação celular foram expressos em termos de nmol de fosfolípido/10⁶ células.

5.2.8. Estudos terapêuticos

Antes do início dos estudos terapêuticos, os animais foram numerados nas orelhas de forma a permitir a sua identificação individual e divididos em grupos de 5 a 6 ratinhos para cada ensaio. Efectuaram-se medições das dimensões dos tumores por recurso a uma craveira (MITUTOYO, 505-646-50, M. N. 85, Morton Grove, IL), duas vezes por semana e durante 52 dias. Os volumes dos tumores (V) foram estimados a partir da expressão (Tomayko e Reynolds, 1989; Radulovic *et al.*, 1991):

$$V = (\pi/6) \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura} \quad (\text{Equação 5.1.})$$

Os resultados em cada grupo de tratamento foram expressos em termos do volume tumoral relativo médio, o qual é uma média dos volumes tumorais relativos, calculados em cada dia e individualmente para cada ratinho, dentro de um determinado grupo. O volume tumoral relativo corresponde à razão (V_t/V_0), em que V_0 é o volume do tumor no início do tratamento e V_t é o volume do tumor no dia t posterior ao início do tratamento (Langdon *et al.*, 1992).

Em cada estudo terapêutico foram constituídos grupos com 5 a 6 ratinhos e os tratamentos, efectuados por via intravenosa através da veia da cauda, foram iniciados quando os tumores apresentaram um volume aproximado de 7 ou 33 mm³; o primeiro dia de tratamento foi designado por dia 0. Para cada um destes estados de desenvolvimento tumoral, efectuaram-se tratamentos durante três semanas, com doses semanais de 3 mg de DXR (livre, DXR-SL ou DXR-SLG)/kg de peso corporal. Em alguns tratamentos, constituíram-se grupos de ratinhos que receberam 10 mg de DXR-SL ou DXR-SLG/kg de

peso corporal e 6 mg de DXR livre/kg de peso corporal. Neste caso, foi necessária a redução da dose de fármaco livre administrada de modo a evitar toxicidade. Todas as experiências incluíram um grupo controlo adicional de ratinhos não tratados e aos quais foi administrada, nas mesmas condições das referidas para os outros grupos, solução tampão HEPES a pH 7,4.

5.2.9. Análise estatística

A diferença estatística entre pares de resultados foi avaliada através do teste t de student. Foram efectuadas comparações múltiplas utilizando análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os resultados foram consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Biodistribuição de lipossomas em ratinhos com tumores subcutâneos

Neste capítulo avaliou-se a biodistribuição dos SL e dos SLG marcados radioactivamente com [125 I]TI, 48 e 72 h após administração, em ratinhos atímicos *Balb/c nude* com tumores H69 implantados subcutaneamente (Figuras 5.1. e 5.2.).

Nestas experiências utilizaram-se SLG preparados pelos métodos de acoplamento PDP-PEG-DSPE ou MAL-PEG-DSPE (respectivamente, SLG_{PDP} e SLG_{MAL}). Embora em ambos os métodos de acoplamento a ligação covalente do antagonista G ao PEG se faça através de uma ligação tioéter e as quantidades de peptídeo acopladas sejam iguais (1 μ g de antagonista G/ μ mol de fosfolípido), correntemente, os SLG_{PDP} apresentaram tamanhos superiores aos dos SLG_{MAL}. No caso específico da presente experiência, os tamanhos dos SLG_{PDP} e dos SLG_{MAL} foram, respectivamente, de 170 e 124 nm. Após 48 e 72 h, a

acumulação no baço dos SLG_{PDP} e SLG_{MAL} foi, aproximadamente, 5 a 10 vezes superior à dos SL (Figura 5.1.). Nos outros órgãos não se registaram diferenças de acumulação entre os SL e quaisquer um dos SLG testados e, com excepção do fígado, a acumulação nos outros órgãos foi reduzida. Após 48 h, os níveis sanguíneos de SL e de SLG_{MAL} (os de SLG_{PDP} não foram determinados) situaram-se entre 6,5 e 9% da dose injectada/g de tecido, tendo diminuído para 1,3 a 1,5% da dose injectada/g de tecido decorridas 72 h (Figura 5.1.).

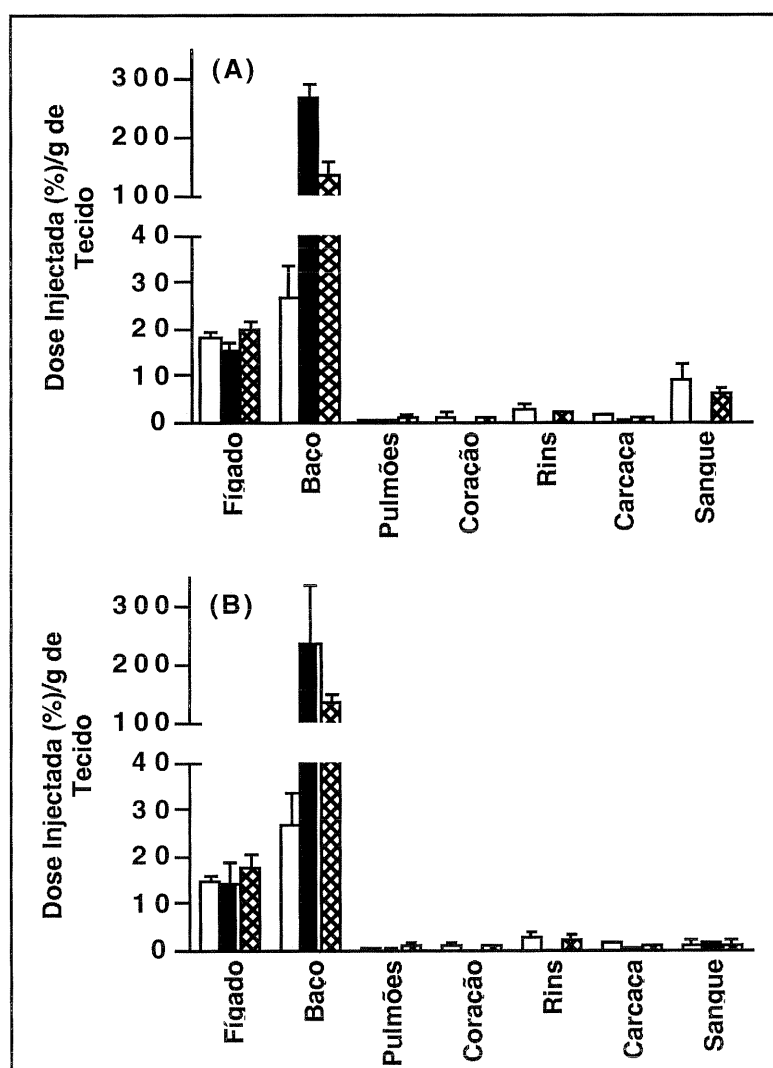


Figura 5.1. - Biodistribuição dos SL e dos SLG em ratinhos atímicos *Balb/c nude* com tumores H69 implantados subcutaneamente. Neste estudo testaram-se lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE e PDP-PEG-DSPE ou MAL-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02, não vectorizados (□) ou vectorizados pelo antagonista G e preparados pelo método de acoplamento PDP-PEG-DSPE (■) ou MAL-PEG-DSPE (▤). Os lipossomas contendo o marcador radioactivo [¹²⁵I]TI, foram administrados numa única vez por via intravenosa (através da veia da cauda dos animais) com uma dose equivalente a 0,5 µmol de fosfolípido/ratinho. Após (A) 48 h ou (B) 72 h, os animais foram sacrificados, após o que se procedeu à amostragem de sangue e recolha dos principais órgãos. Seguidamente realizou-se a contagem de [¹²⁵I] em cada um dos tecidos recolhidos. Os resultados de biodistribuição foram expressos em termos da percentagem de dose injectada/g de tecido e são a média de 3 ratinhos, ± desvios padrão.

A acumulação tumoral dos SL e dos SLG_{MAL}, tanto ao fim de 48 como de 72 h, foi semelhante ($P > 0,05$), tendo-se cifrado em cerca de 4% da dose injectada/g de tecido decorridas 72 h (Figura 5.2.). A acumulação tumoral dos SLG_{PDP} ao fim de 72 h foi, aproximadamente, 12 vezes inferior ($P < 0,001$; Figura 5.2.), podendo este facto estar relacionado com o maior tamanho destes lipossomas e com a sua maior acumulação ao nível do baço (Figura 5.1.).

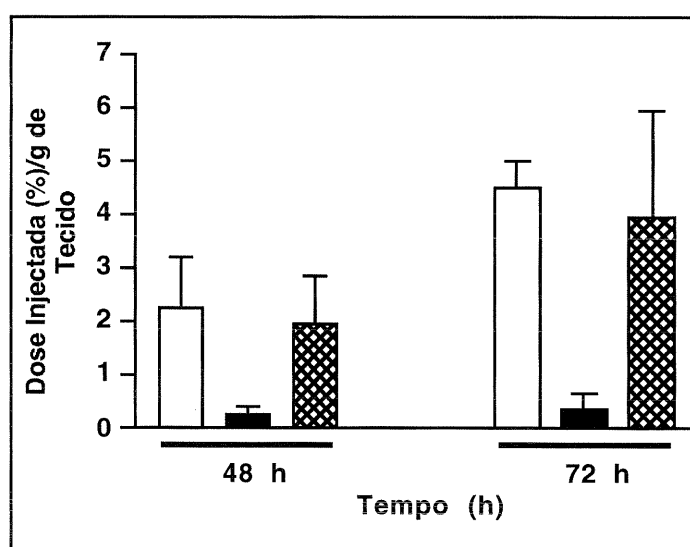


Figura 5.2. - Acumulação tumoral dos SL e SLG em ratinhos atímicos *Balb/c nude* com tumores H69 implantados subcutaneamente. As condições e os símbolos são as referidas na Figura 5.1.. Após 48 e 72 h, procedeu-se à recolha dos tumores e contagem de [¹²⁵I]. Os resultados foram expressos em termos da percentagem de dose injectada/g de tecido e são a média de 3 ratinhos, \pm desvios padrão.

5.3.2. Associação celular de lipossomas

Ainda que tenha ficado demonstrado que os SLG_{MAL} apresentam um maior nível de acumulação tumoral que os SLG_{PDP}, é importante avaliar se a mudança do método de acoplamento não afecta a associação celular dos lipossomas. É possível observar que, com células H69 desenvolvidas em cultura, não existem quaisquer diferenças entre os SLG_{MAL} e os SLG_{PDP} (Figura 5.3.A). Devido à menor acumulação tumoral dos SLG_{PDP}, apenas os SLG_{MAL} foram testados nas experiências seguintes.

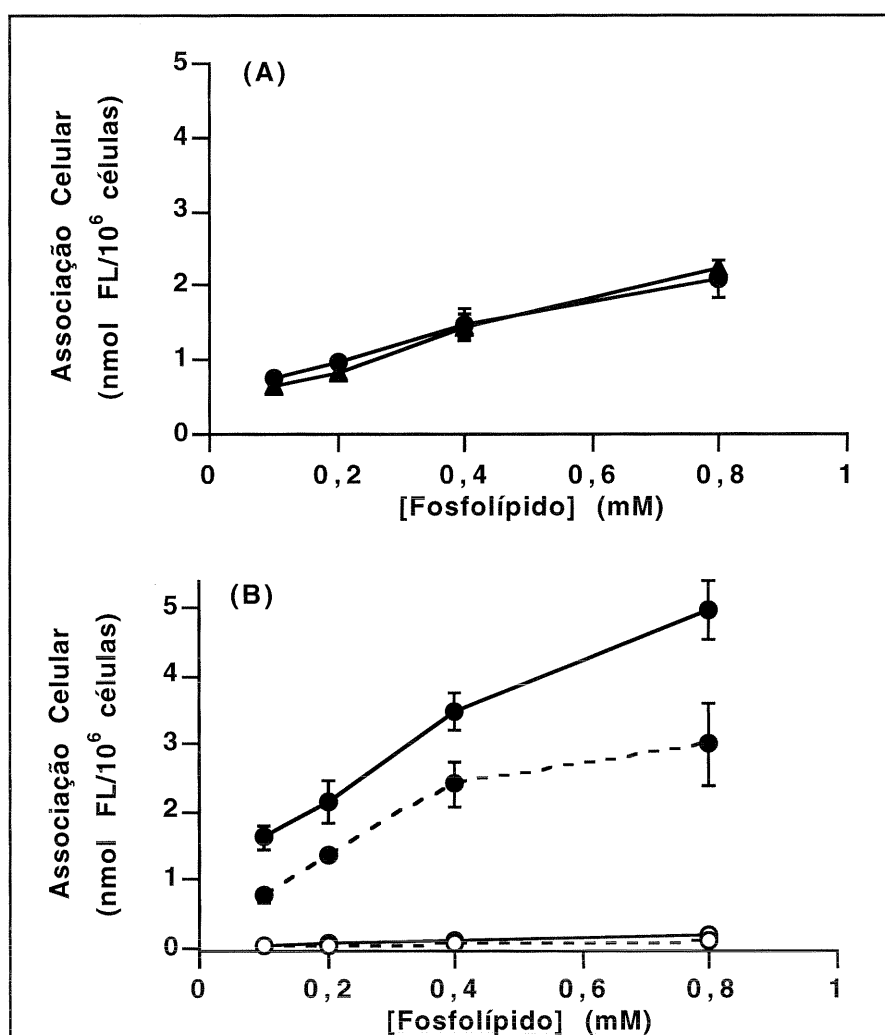


Figura 5.3. - Associação celular de lipossomas, marcados radioativamente com $[^3\text{H}]\text{CHE}$, com as células H69. Lipossomas constituídos por HSPC:CHOL:PEG-DSPE:PDP-PEG-DSPE ou MAL-PEG-DSPE, numa razão molar de 2:1:0,08:0,02, foram incubados, em concentrações de fosfolípido que variaram entre 0,1 e 0,8 mM/poço, com 1×10^6 células H69. (A) Células H69 desenvolvidas em cultura foram incubadas durante 1 h a 37°C com SLGpDP (—▲—) ou SLGMAL (—●—). (B) Células H69 obtidas a partir de tumores subcutâneos H69 submetidos a 4 ou a 11 passagens, foram incubadas com SL (—○— e - -○- -, para tumores de 4^a ou 11^a gerações, respectivamente) ou SLGMAL (—●— e - -●- -, para tumores de 4^a ou 11^a gerações, respectivamente). A quantidade de lipossomas associados às células foi determinada por contagem de cintilações e a associação celular dos lipossomas foi calculada a partir da actividade específica inicial dos lipossomas marcados com $[^3\text{H}]\text{CHE}$. Os resultados foram expressos em termos de nmol de fosfolípido/ 1×10^6 células. Os resultados são a média de 3 amostras, \pm desvios padrão, obtidos a partir de uma experiência representativa.

Atendendo a que a expressão de receptores à superfície das células tumorais constitui um factor crucial para a aplicabilidade das estratégias de vectorização mediada por ligandos, testou-se a associação celular dos SLGMAL com células H69 obtidas a partir de tumores subcutâneos de 4^a e 11^a geração (Figura 5.3.B). A associação celular dos SLGMAL com as

células H69 de um tumor de 11^a geração foi ligeiramente inferior à obtida com um tumor de 4^a geração, todavia, sendo ainda cerca de 40 vezes superior à associação celular observada com os SL, nas mesmas condições experimentais. Estes resultados são indicativos de que, *in vivo*, os receptores que reconhecem o antagonista G continuam a ser expressos a um nível suficiente para que, no que a este parâmetro diz respeito, ocorra a vectorização de lipossomas mediada pelo antagonista G nos termos apresentados no capítulo 2.

5.3.3. Estudos terapêuticos

Os ratinhos atímicos *Balb/c nude* com tumores subcutâneos H69 foram tratados com DXR livre, DXR-SL ou DXR-SLG. É de salientar que na sequência dos tratamentos efectuados, não se observaram perdas de peso superiores a 20% em relação ao peso original registado antes do início do tratamento nem se observaram quaisquer mortes. Nestes ratinhos, a dose máxima tolerada de DXR livre foi de 18 mg/kg de peso corporal enquanto que de DXR lipossómica foi de 30 mg/kg de peso corporal, quando administradas durante três semanas, respectivamente, em doses semanais de 6 e de 10 mg/kg de peso corporal. Os resultados dos tratamentos foram expressos em termos de volume tumoral relativo médio (Figuras 5.4. e 5.5.).

O tratamento dos ratinhos com DXR-SL ou DXR-SLG para doses de 3 mg de DXR lipossómica/kg de peso corporal quando o tumor se encontra na sua fase inicial de crescimento exponencial (correspondente a um volume tumoral médio de 7 mm³), determinou uma ligeira diminuição na velocidade de crescimento do tumor, relativamente aos tumores não tratados ou tratados com fármaco livre na mesma dose. Todavia, nestas condições, não se observaram quaisquer diferenças entre os tratamentos efectuados com lipossomas não vectorizados ou vectorizados pelo antagonista G (Figura 5.4.A).

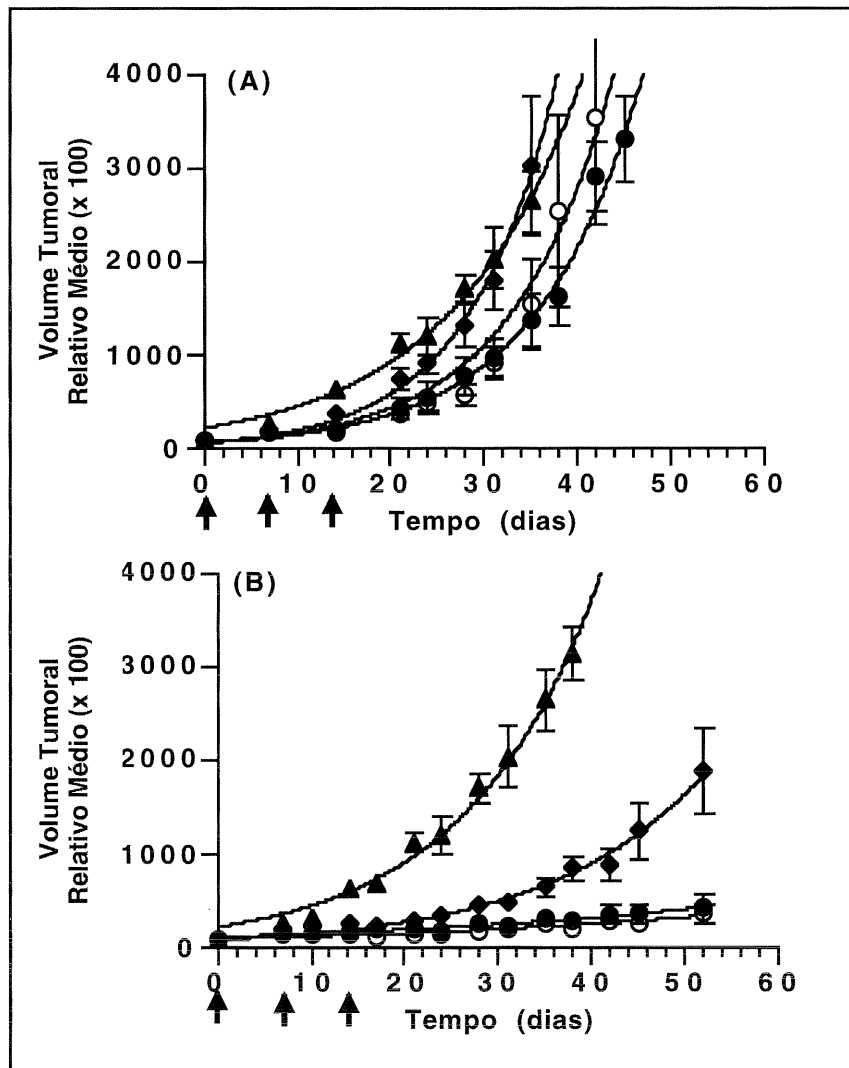


Figura 5.4. - Eficácia antitumoral de várias formulações de DXR contra tumores subcutâneos de cancro humano de pequenas células do pulmão (H69), numa fase inicial de desenvolvimento e implantados em ratinhos atímicos *Balb/c nude*. Os tratamentos tiveram início para volumes tumorais médios de cerca de 7 mm^3 e o primeiro dia de tratamento foi designado por dia 0. Os ratinhos foram tratados nos dias 0, 7 e 14 com (A) 3 mg de DXR/kg de peso corporal e correspondente a DXR livre (—◆—), DXR-SL (—○—) ou DXR-SLG (—●—); (B) 6 mg de DXR livre/kg de peso corporal (—◆—) e 10 mg de DXR/kg de peso corporal e correspondente a DXR-SL (—○—) ou DXR-SLG (—●—). Aos ratinhos não tratados foi administrada nas mesmas condições solução tampão HEPES a pH 7,4 (—▲—). As setas indicam os dias de realização dos tratamentos. Os resultados foram expressos em termos de volume tumoral relativo médio (determinado de acordo com o descrito na secção 5.2.8.) e são a média de 5 a 6 ratinhos, \pm erro padrão médio.

A realização dos tratamentos na mesma fase de desenvolvimento tumoral (para volumes tumorais iniciais de 7 mm^3), mas agora com doses superiores de DXR lipossômica (três doses semanais de 10 mg/kg de peso corporal), inibiu quase completamente o crescimento tumoral, embora não se tenham registado diferenças entre os dois tratamentos com lipossomas testados. A DXR livre administrada na sua dose máxima tolerada (três

doses semanais de 6 mg/kg de peso corporal), foi significativamente menos eficaz que os tratamentos com DXR-SL ou DXR-SLG (Figura 5.4.B).

Para tratamentos com doses de 3 mg de DXR/kg de peso corporal, mas agora para fases mais avançadas de desenvolvimento tumoral (correspondente no início do tratamento a um volume tumoral aproximado de 33 mm³; Figura 5.5.A), a DXR livre não apresentou qualquer actividade terapêutica. O tratamento com DXR-SL ou DXR-SLG determinou

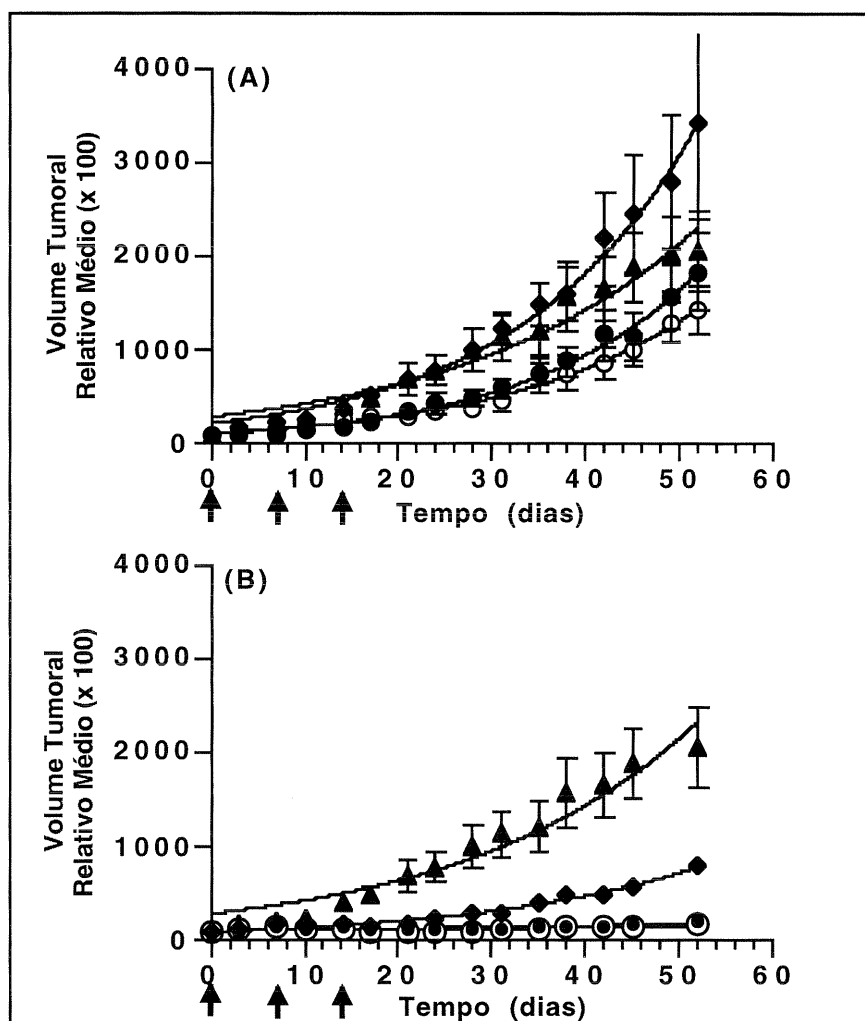


Figura 5.5. - Eficácia antitumoral de várias formulações de DXR contra tumores subcutâneos de cancro humano de pequenas células do pulmão (H69), em fase avançada de desenvolvimento e implantados em ratinhos atímicos *Balb/c nude*. Os tratamentos tiveram início para volumes tumorais médios de cerca de 33 mm³ e o primeiro dia de tratamento foi designado por dia 0. Os ratinhos foram tratados nos dias 0, 7 e 14 com (A) 3 mg de DXR/kg de peso corporal e correspondente a DXR livre (—◆—), DXR-SL (—○—) ou DXR-SLG (—●—); (B) 6 mg de DXR livre/kg de peso corporal (—◆—) e 10 mg de DXR/kg de peso corporal e correspondente a DXR-SL (—○—) ou DXR-SLG (—●—). Aos ratinhos não tratados foi administrada nas mesmas condições solução tampão HEPES a pH 7,4 (—▲—). As setas indicam os dias de realização dos tratamentos. Os resultados foram expressos em termos de volume tumoral relativo médio (determinado de acordo com o descrito na secção 5.2.8.) e são a média de 5 a 6 ratinhos, ± erro padrão médio.

alguma inibição do crescimento tumoral, no entanto, também neste caso não se registaram diferenças entre estes dois tratamentos.

Nesta fase avançada de desenvolvimento tumoral, o aumento das doses de lipossomas (DXR-SL ou DXR-SLG) para 10 mg DXR/kg de peso corporal resultou numa acentuada inibição do crescimento tumoral (Figura 5.5.B). O tratamento com fármaco livre na sua dose máxima tolerada foi menos eficaz que qualquer dos tratamentos com lipossomas efectuados, mas ainda assim mais eficaz que no caso dos ratinhos não tratados (Figura 5.5.B).

5.4. DISCUSSÃO

A agressividade do cancro humano de pequenas células do pulmão, a par da taxa de sobrevivência reduzida dos pacientes com este tipo de tumor (Jones *et al.*, 1997), torna urgente o desenvolvimento de novas e mais eficazes estratégias terapêuticas. As características fisiológicas únicas inerentes aos tumores sólidos, como sejam, a angiogénese, a existência de vasos sanguíneos mal formados (porosos) e uma drenagem linfática deficiente (Brown e Giaccia, 1998; Hashizume *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2000) criam excelentes condições para a acumulação selectiva de lipossomas. Os tempos de circulação sanguínea prolongados de fármacos, como a DXR, encapsulados em lipossomas estabilizados estereamente com PEG, a sua estabilidade *in vivo* e o aumento da permeabilidade vascular ao nível do tumor, constituem características fundamentais para o aumento da eficácia terapêutica proporcionadas por estas formulações, em relação, nomeadamente, aos respectivos fármacos livres (Gabizon *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993; Gabizon *et al.*, 1994; Northfelt *et al.*, 1996).

Como já referido no decurso desta dissertação, existem já algumas evidências experimentais que do acoplamento covalente de ligandos específicos, nomeadamente anticorpos monoclonais, na extremidade de cadeias de PEG incorporado à superfície de lipossomas resultam vantagens terapêuticas relativamente às formulações lipossómicas não

vectorizadas (Ahmad *et al.*, 1993; Lopes de Menezes *et al.*, 1998). No entanto, os anticorpos monoclonais não serão, contudo, os agentes de vectorização mais apropriados. Foi já demonstrado que a utilização de anticorpos monoclonais para vectorizar lipossomas estabilizados estereamente com PEG é susceptível de aumentar a acumulação destes nas células do sistema monocítico fagocitário, num processo mediado pelos receptores que reconhecem a fracção Fc dos referidos anticorpos (Harasym *et al.*, 1998). A extensão desta acumulação é significativamente inferior para lipossomas não vectorizados ou para lipossomas vectorizados por fragmentos Fab' de anticorpos monoclonais, os quais são desprovidos da porção Fc do anticorpo monoclonal (Maruyama *et al.*, 1997). Da captura pelas células do sistema monocítico fagocitário resulta uma diminuição dos tempos de circulação sanguínea dos lipossomas vectorizados pelos anticorpos monoclonais (Harding *et al.*, 1997; Maruyama *et al.*, 1997; Sapa e Allen, 2001), e uma conseqüente diminuição da sua acumulação tumoral (Maruyama *et al.*, 1997). No estudo realizado por Sapa e Allen (2001) foi ainda observado que a vectorização de lipossomas com fragmentos Fab' (anti-CD19) aumentou de forma significativa a sua associação celular e a citotoxicidade da vincristina encapsulada, em relação aos mesmos lipossomas vectorizados com o correspondente anticorpo monoclonal.

É de realçar que, ao nível do tumor, outras barreiras se poderão colocar aos lipossomas vectorizados com anticorpos monoclonais. De facto, a sua penetração no seio da massa tumoral poderá ser comprometida pela sua ligação acentuada aos receptores celulares existentes na periferia do tumor (Juweid *et al.*, 1992). A penetração tumoral poderá ser melhorada pela utilização de agentes de vectorização mais pequenos e com menor avidéz (e/ou afinidade) para os receptores *alvo*, como sejam os fragmentos dos anticorpos monoclonais (comparativamente com o correspondente anticorpo monoclonal) ou os peptídeos (Yokota *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 2001).

Neste contexto, e no seguimento dos resultados obtidos até ao momento, em particular com a linha celular H69, juntamente com os dados de farmacocinética e biodistribuição (todos apresentados no capítulo 2), avaliou-se a acumulação tumoral e a

eficácia terapêutica das formulações estudadas contra tumores subcutâneos H69 implantados em ratinhos atímicos *Balb/c nude*. Peptídeos pequenos como o antagonista G, têm a vantagem, em relação a anticorpos monoclonais, de serem não imunogênicos, quimicamente bem definidos e susceptíveis de serem sintetizados em grandes quantidades e desprovidos de contaminantes biológicos (Boeckler *et al.*, 1999).

Neste estudo foram utilizados lipossomas vectorizados pelo antagonista G preparados por duas estratégias de acoplamento que envolvem diferentes metodologias de preparação. Os lipossomas preparados pelo método de acoplamento PDP-PEG-DSPE apresentaram um maior diâmetro médio, uma maior acumulação no baço e uma menor acumulação tumoral, relativamente aos lipossomas preparados pelo método de acoplamento MAL-PEG-DSPE. A menor acumulação tumoral dos SLG_{PDP} está provavelmente relacionada com a maior acumulação no baço (que resultará num menor número de lipossomas disponíveis na circulação para extravasarem para o tumor) e com o seu maior diâmetro médio. Concretamente a este respeito, estudos anteriores demonstraram que a extravasão de lipossomas com PEG do compartimento vascular para o interstício tumoral depende do tamanho dos lipossomas. Este parâmetro determina a capacidade dos lipossomas se difundirem através dos poros da parede vascular que, consoante o tipo de tumor, podem variar entre 100 e 1200 nm (Yuan *et al.*, 1995; Hobbs *et al.*, 1998).

Embora tenha sido observado um aumento acentuado da associação dos SLG, relativamente aos SL, às células H69 (obtidas a partir dos respectivos tumores subcutâneos) (Figura 5.3.B), em consonância com os resultados apresentados no capítulo 2 (Figura 2.3.A), não se registou qualquer tipo de diferença entre os SLG e os SL em termos de acumulação tumoral (Figura 5.2.). Este resultado confirma as observações registadas por outros autores, em que a vectorização de lipossomas mediada por ligandos não determina o aumento da acumulação dos lipossomas em tumores sólidos (Goren *et al.*, 1996; Maruyama *et al.*, 1997; Kirpotin *et al.*, 1998). Desta forma, a acumulação dos lipossomas vectorizados em tumores sólidos parece ser função do mesmo factor que governa a acumulação tumoral

dos lipossomas não vectorizados, ou seja, a extravasão por difusão passiva.

No caso dos estudos realizados com lipossomas vectorizados com fragmentos do anticorpo monoclonal (4D5) anti-glicoproteína p185^{HER2} contra células humanas de cancro da mama (tumores subcutâneos BT-474), observou-se uma maior eficácia terapêutica da formulação lipossómica de DXR vectorizada relativamente à não vectorizada. No entanto, à semelhança do verificado neste trabalho, também nesse estudo a acumulação tumoral de lipossomas vectorizados no modelo animal utilizado foi análoga à dos lipossomas não vectorizados (Park *et al.*, 1997). Estudos posteriores sugeriram que a ocorrência de regressão tumoral, na sequência dos tratamentos com a formulação vectorizada, poderá ser explicada com base em diferenças na localização intratumoral entre lipossomas com e sem ligando. Experiências de microscopia electrónica revelaram que os lipossomas vectorizados com o fragmento do anticorpo monoclonal encontram-se largamente distribuídos nos espaços intercelulares de tumores HER2+, bem como ao nível do citoplasma e dos espaços perinucleares das células tumorais. Os lipossomas não vectorizados, por seu turno, localizam-se ao nível de macrófagos existentes no tumor e em áreas perivasculares (Kirpotin *et al.*, 1998).

No modelo animal utilizado neste trabalho, apesar das formulações lipossómicas apresentarem maior eficácia terapêutica do que o tratamento com a DXR livre, não se observaram quaisquer diferenças entre a DXR-SL e a DXR-SLG. Resultados semelhantes foram também descritos com lipossomas de DXR vectorizados com o anticorpo monoclonal N12A5, também anti-glicoproteína p185^{HER2}, num modelo de carcinoma gástrico. Este facto foi atribuído a uma possível ausência de internalização celular dos lipossomas vectorizados (Goren *et al.*, 1996). No entanto, e como já demonstrado, os SLG são internalizados pelas células H69, pelo que, a ausência de internalização celular não poderá explicar os resultados dos estudos terapêuticos apresentados neste capítulo.

Uma possível explicação poderá ser baseada na reduzida vascularização dos tumores subcutâneos H69, nomeadamente em relação aos tumores BT-474, os quais são bem vascularizados (Kirpotin *et al.*, 1998). A análise histológica dos tumores subcutâneos H69

demonstrou que estes tumores são na realidade pouco vascularizados, confirmando assim observações macroscópicas. Esta, aliás, parece ser uma característica comum aos tumores subcutâneos de cancro humano de pequenas células do pulmão (Boerman *et al.*, 1991). Este é um aspecto que poderá limitar a quantidade de fármaco lipossómico que se acumula nos tumores. Assim, talvez com base neste facto se poderá justificar que a acumulação de lipossomas nos tumores subcutâneos H69 seja cerca de duas vezes inferior à registada nos tumores BT-474. Poderia ainda discutir-se se uma reduzida vascularização tumoral afectaria de forma diferente a acumulação dos lipossomas vectorizados e não vectorizados. Porém, é possível observar na Figura 5.2. que não há diferenças na acumulação entre os lipossomas vectorizados (SLG_{MAL}) e os não vectorizados, daí que, até certa medida, não seja surpreendente a semelhança na actividade terapêutica observada para estas duas formulações. Um outro factor que, concomitantemente ou não com a reduzida vascularização, poderá contribuir para os diferentes resultados terapêuticos obtidos com os modelos H69 e BT-474 consiste na diferença de densidade de receptores específicos para os ligandos utilizados num e noutro modelo. Os resultados dos estudos de associação dos SLG com as células H69 obtidas a partir dos tumores subcutâneos (Figura 5.3.B), demonstraram que o processo de propagação *in vivo* do tumor durante várias gerações não afectou a expressão dos receptores que reconhecem especificamente o antagonista G. Todavia, pode acontecer que, à partida, a densidade de receptores para o antagonista G nas células H69 seja inferior à densidade de expressão da glicoproteína p185^{HER2} no modelo BT-474.

Outro aspecto que se deve ter em consideração, reside no facto de se saber se o antagonista G acoplado aos lipossomas se mantém quimicamente intacto após administração intravenosa, de forma a que a sua capacidade de ligação aos receptores nas células tumorais não seja comprometida. Como já referido em ocasiões anteriores neste trabalho, o antagonista G é um hexapeptídeo que apresenta a estrutura H-Arg-D-Trp-N^{me}Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂. A actividade biológica deste peptídeo depende da sua ligação a receptores (nomeadamente da vasopressina) existentes à superfície das células H69 através da sequência de aminoácidos D-Trp-N^{me}Phe-D-Trp-Leu (Woll e Rozengurt, 1990). O estudo do

metabolismo do antagonista G *in vivo* demonstrou que a sua via principal de degradação ocorre por desamidação ao nível do resíduo de metionina, seguida da remoção deste por acção de carboxipeptidases (Cummings *et al.*, 1995). De forma menos acentuada, ocorre também a oxidação ao nível do resíduo de metionina. Nestas condições, é de registar que o núcleo hidrofóbico do peptídeo, indispensável à sua ligação aos receptores nas células tumorais, se mantém intacto (Cummings *et al.*, 1995). Em adição, estudos *in vitro* demonstraram que os metabolitos resultantes da principal via de degradação do antagonista G, retêm intactas as propriedades originais de antagonismo do factor de crescimento, vasopressina (Jones *et al.*, 1995b). Estes dados sugerem que o antagonista G acoplado a lipossomas com PEG é susceptível de manter, *in vivo*, as suas propriedades de ligação aos receptores. Desta maneira, outros factores, que não a ausência de ligação do peptídeo aos receptores celulares, estarão na base da semelhança na actividade terapêutica entre a DXR-SL e a DXR-SLG.

Os resultados apresentados neste capítulo realçam que, mesmo quando a vectorização de lipossomas mediada por ligandos resulta em internalização pelas células tumorais, outros factores, como a densidade vascular e/ou o grau de perfusão no seio da massa tumoral, podem ser factores decisivos para o sucesso terapêutico dos fármacos lipossómicos vectorizados. Os sucessos anteriores obtidos no tratamento de células tumorais no compartimento vascular (Lopes de Menezes *et al.*, 1998) ou no tratamento de lesões metastáticas pulmonares recentes (Ahmad *et al.*, 1993; Moase *et al.*, 2001), reforçam a importância da avaliação da eficácia dos lipossomas vectorizados pelo antagonista G na eliminação de células circulantes, num modelo animal metastático ou pseudometastático. Uma vez que o cancro humano de pequenas células do pulmão tem o potencial de metastização mais elevado, de entre todos os tumores sólidos humanos (Moore *et al.*, 1998), os lipossomas de DXR vectorizados pelo antagonista G poderão ter um papel importante como terapia adjuvante contra as células metastáticas de cancro humano de pequenas células do pulmão circulantes no sangue. No entanto, e de acordo com o mencionado na secção

5.2.5., será necessário o desenvolvimento de um modelo animal apropriado para testar esta hipótese. Dos resultados apresentados, destaca-se, todavia, o potencial terapêutico dos lipossomas Stealth® (não vectorizados) contendo DXR contra o cancro humano de pequenas células do pulmão.



*Tese de Doutoramento
Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra
2001*

CAPÍTULO 6

Considerações finais e perspectivas futuras

A sequenciação recente do genoma humano, constituirá, entre outras, a base do aparecimento acelerado de novas entidades químicas com grande potencial terapêutico. Naturalmente, a aplicação clínica destas moléculas dependerá, em larga medida, do desenvolvimento de formulações adequadas. No entanto, este é um problema que se coloca tanto a estas novas entidades químicas como a qualquer fármaco que possa estar a ser utilizado clinicamente, como tem sido o caso dos citostáticos em quimioterapia convencional. Algumas das propriedades associadas a estes fármacos, como sejam, a rápida eliminação sanguínea, a elevada toxicidade ou a reduzida acumulação em órgãos *alvo*, fazem com que a sua eficácia terapêutica esteja longe da ideal. Para fármacos que tenham já sido objecto de aprovação para uso clínico, a alteração da formulação pela qual são veiculados, poderá alterar os seus perfis farmacocinéticos e de biodistribuição, de toxicidade e, em última instância, melhorar os seus índices terapêuticos. De entre as várias estratégias susceptíveis de cumprir estes objectivos, a encapsulação de fármacos em lipossomas assume uma posição de relevo.

Como revisto no capítulo 1, desde a proposta de utilização dos lipossomas como vectores de fármacos em meados da década de 70 (Gregoriadis, 1973; Gregoriadis, 1976a; Gregoriadis, 1976b) um longo caminho foi percorrido. Este trajecto culminou com a aprovação clínica dos lipossomas (ditos clássicos ou convencionais) de daunorrubicina, DaunoXome[®], para o tratamento do sarcoma de Kaposi (Gill *et al.*, 1995), e dos lipossomas de anfotericina B, AmBisome[®], para o tratamento de infecções sistémicas (Janknegt *et al.*, 1992; Clemons e Stevens, 1993; van Etten *et al.*, 1993; Russo *et al.*, 1996). Apesar da sua utilidade ter sido demonstrada, estas formulações lipossómicas não deixam de apresentar a desvantagem dos seus padrões farmacocinéticos e de biodistribuição serem dependentes da dose administrada. O desenvolvimento dos lipossomas estabilizados estereamente com compostos hidrofílicos (de que se destaca o PEG₂₀₀₀-DSPE) permitiu ultrapassar este problema. Em adição, conferiu também maior versatilidade a estas formulações no que diz respeito à dependência dos seus padrões farmacocinéticos e de biodistribuição em relação a parâmetros físico-químicos, como o tamanho ou a temperatura de transição de fase do componente lipídico principal. As cadeias hidrofílicas, flexíveis e hidratadas de PEG

reduzem de forma significativa a rapidez e a extensão de interações electrostáticas ou hidrofóbicas entre a superfície da membrana lipossómica e os vários componentes do sangue que possam mediar a sua eliminação e/ou desintegração (Lasic *et al.*, 1991; Needham *et al.*, 1992; Woodle *et al.*, 1992a; Torchilin *et al.*, 1994). O desenvolvimento desta tecnologia culminou com a aprovação clínica dos lipossomas de DXR, Caelyx[®], no tratamento do sarcoma de Kaposi em doentes com o síndrome da imunodeficiência adquirida (Bergin *et al.*, 1995; Lasic, 1996; Northfelt *et al.*, 1996; Northfelt *et al.*, 1998) e como quimioterapia de segunda linha contra o cancro do ovário (Muggia *et al.*, 1997; Gordon *et al.*, 2000).

A melhoria da especificidade e da eficácia de acção das formulações lipossómicas já existentes, bem como daquelas que possam resultar do desenvolvimento de novas entidades químicas, particularmente se o seu local de acção for intracelular, pode ser conseguida através do aumento da cedência intracelular do conteúdo dos lipossomas. Neste contexto, e atendendo a que as células tumorais têm uma capacidade fagocítica (de partículas como os lipossomas) muito reduzida, o acoplamento covalente na extremidade das cadeias hidrofílicas de PEG de ligandos, específicos para receptores das células tumorais e capazes de desencadear internalização celular dos lipossomas, tem-se revelado uma estratégia com grande potencial (Lee e Low, 1994; Allen *et al.*, 1995b; Hansen *et al.*, 1995; Lopes de Menezes *et al.*, 1999; Pagnan *et al.*, 2000). Foi já demonstrado que a vectorização de lipossomas de DXR com anticorpos monoclonais é susceptível de proporcionar uma melhoria da actividade terapêutica relativamente às formulações lipossómicas não vectorizadas (Ahmad *et al.*, 1993; Lopes de Menezes *et al.*, 1998). No entanto, no caso de tumores sólidos subcutâneos, a utilização de anticorpos monoclonais como ligandos de vectorização, para além de limitada pelos seus custos de produção e potencial imunogénico (Harding *et al.*, 1997), poderá também limitar a penetração dos lipossomas no seio da massa tumoral (Juweid *et al.*, 1992). Moléculas mais pequenas, como por exemplo peptídeos, com menor afinidade para os receptores nas células tumorais, quimicamente bem definidos, susceptíveis de serem produzidos em grandes quantidades e desprovidos de contaminantes biológicos, poderão ter um papel proeminente como agentes de vectorização de lipossomas.

Como mencionado na secção 1.1., o cancro humano de pequenas células do pulmão é uma doença incurável e com uma esperança de vida muito reduzida, devido ao seu rápido crescimento e disseminação. Assim sendo, é premente o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objectivo desenvolver um sistema de vectorização mediado por ligandos, utilizando como base de trabalho os lipossomas com PEG contendo DXR, e estudar a sua aplicabilidade contra o cancro humano de pequenas células do pulmão. O ligando testado foi um hexapeptídeo designado por antagonista G, o qual é um antagonista de factores de crescimento secretados pelas células de cancro humano de pequenas células do pulmão.

Neste capítulo apresentam-se, em síntese, as principais conclusões obtidas nos estudos efectuados e apontam-se algumas hipóteses de trabalho futuras.

Para a concretização da estratégia que é proposta neste trabalho, é importante que da interacção entre os lipossomas vectorizados e as células tumorais ocorra a internalização celular dos primeiros. Todavia, diversos exemplos revelam que da ligação deste tipo de lipossomas aos receptores celulares, não decorre necessariamente a endocitose dos lipossomas (Nässander *et al.*, 1995; Goren *et al.*, 1996). Nos estudos realizados no capítulo 2, demonstrou-se que o acoplamento covalente do antagonista G nas extremidades das cadeias de PEG (1 µg de antagonista G/µmol de fosfolípido), através do método de acoplamento PDP-PEG-DSPE (formação de uma ligação tioéter), proporciona a vectorização dos lipossomas para a linha celular clássica de cancro humano de pequenas células do pulmão, H69. Esta vectorização demonstrou ser específica para o ligando utilizado, bem como, para a população celular de cancro humano de pequenas células do pulmão testada. A interacção entre os lipossomas vectorizados e as células tumorais engloba, primeiramente, a ligação multivalente dos SLG aos receptores celulares específicos existentes nas células H69.

Daqui resulta a internalização celular dos primeiros (num máximo de 13000 SLG/célula), através de um processo mediado por receptores e que envolve a formação intracelular de vesículas revestidas com clatrina. Na sequência destes eventos, observou-se que a acumulação de DXR no núcleo (principal local de acção deste fármaco) é significativamente melhorada quando as células tumorais são tratadas com o fármaco encapsulado nos SLG. Foi possível concluir que a maior parte da DXR nuclear obtida na sequência da exposição das células à DXR-SLG, resulta, predominantemente, da libertação intracelular (ao nível dos endossomas e/ou lisossomas) a partir da correspondente DXR-SLG que foi internalizada. Em todo este processo intracelular, é de considerar uma possível reciclagem dos receptores para a superfície das células tumorais, estando assim, novamente disponíveis para ligar e internalizar novos lipossomas vectorizados pelo antagonista G. O conjunto destes fenómenos culmina com o aumento da actividade citotóxica da DXR veiculada pelos SLG (que mostrou ser dependente da presença de receptores celulares específicos para o antagonista G), relativamente à actividade do mesmo fármaco encapsulado em lipossomas sem antagonista G.

No âmbito do cancro humano de pequenas células do pulmão, apesar da proeminência da forma dita clássica (que representa cerca de 70% do total de cancro humano de pequenas células do pulmão), existe outra, designada por variante, resultante da transformação da primeira. Esta transformação, que poderá ser consequência do tratamento com quimioterapia (Brambilla *et al.*, 1991), está associada a possíveis alterações da expressão de proteínas membranares (receptores), a um aumento da proliferação celular, a uma amplificação da expressão do proto-oncogene *c-myc* e a uma maior resistência à quimioterapia (Gazdar *et al.*, 1985; Fay *et al.*, 1994). O estudo da interacção entre os lipossomas vectorizados pelo antagonista G e a linha celular variante de cancro humano de pequenas células do pulmão, H82 (capítulo 3), sugere, pela primeira vez, que estas células também expressam receptores para o antagonista G, numa densidade semelhante à da linha celular clássica H69 (capítulo 2). Assim, de alguma maneira, se justifica que o padrão de

interacção dos SLG com as células H82 em termos de internalização celular (12000 SLG internalizados/célula), libertação intracelular da DXR e citotoxicidade, seja semelhante ao observado para a linha celular H69.

De registar que para ambas as linhas celulares ficou demonstrado que a acção citotóxica da DXR encapsulada nos SLG é consequência apenas da eficiência de cedência intracelular proporcionada por esta formulação, não se tendo observado qualquer efeito sinérgico entre a DXR e qualquer um dos componentes dos lipossomas.

Na Figura 6.1. representam-se esquematicamente os principais aspectos da interacção entre os lipossomas vectorizados pelo antagonista G, contendo DXR, e o cancro humano de pequenas células do pulmão, tanto na forma clássica como na forma variante, que emergem dos estudos *in vitro* apresentados nos capítulos 2 e 3.

No trabalho apresentado no capítulo 4, testou-se a aplicabilidade de uma nova metodologia de preparação de lipossomas vectorizados por ligandos na preparação de SLG. Nesta metodologia, designada por técnica de pós-inserção, o antagonista G é acoplado covalentemente, através de uma ligação tioéter, à extremidade das cadeias de PEG derivatizadas com o fosfolípido DSPE e organizadas sob a forma de micelas. Seguidamente, os conjugados de antagonista G-PEG-DSPE são transferidos, num único passo, da fase micelar para lipossomas pré-formados.

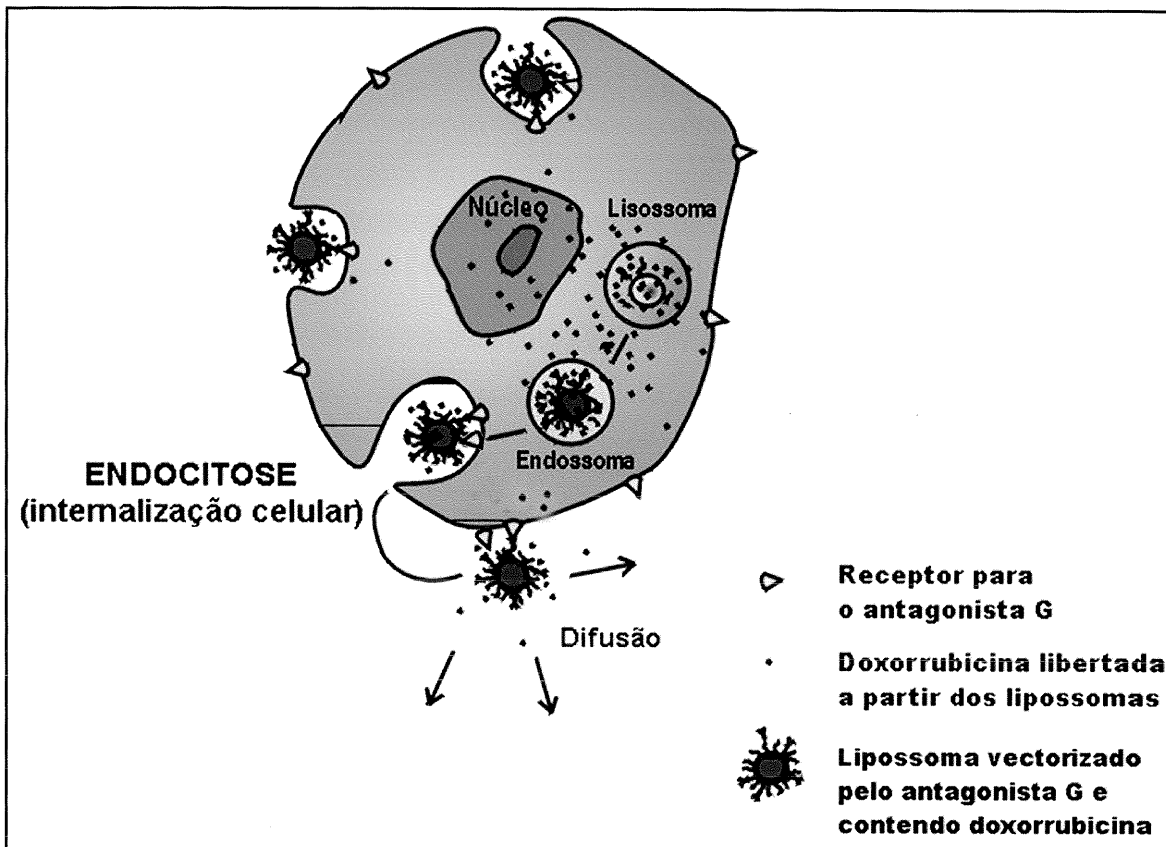


Figura 6.1. - Representação esquemática da interacção entre os lipossomas de DXR vectorizados pelo antagonista G e as células de cancro humano de pequenas células do pulmão (forma clássica e forma variante). Na sequência do acoplamento covalente do antagonista G na extremidade das cadeias de PEG inseridos na membrana de lipossomas contendo DXR, estes ligam-se de forma multivalente e especificamente a receptores existentes à superfície de células de cancro humano de pequenas células do pulmão. Desta ligação, resulta a internalização celular dos primeiros. Consequentemente, dá-se a libertação intracelular de DXR ao longo do tempo (ao nível dos endossomas e/ou lisossomas), difundindo-se posteriormente para o núcleo. Em todo este processo é de considerar uma possível reciclagem dos receptores para a superfície das células tumorais, estando assim, novamente disponíveis para ligar e internalizar novos lipossomas vectorizados pelo antagonista G (não representado no diagrama). No que diz respeito à DXR que atinge o núcleo, existe uma pequena quantidade de fármaco que se difunde a partir dos lipossomas vectorizados que existem nas imediações das células tumorais, ligados ou não aos receptores celulares específicos (desenho gentilmente cedido pela Dra. T. M. Allen).

Esta tecnologia de preparação de lipossomas vectorizados conduziu à obtenção de PLG com cerca de 0,3 μg de antagonista G/ μmol de fosfolípido, sem afectar de forma significativa o tamanho final dos lipossomas. Foi observado que para quantidades equivalentes de antagonista G acopladas, os PLG apresentam uma associação celular superior à dos SLG. Na base deste resultado, poderá estar o facto de no caso do acoplamento do peptídeo pelo método convencional, devido à hidrofobicidade e reduzidas dimensões moleculares do antagonista G, ocorrer um certo nível de associação não específica

de peptídeo com a membrana lipossómica (que é da ordem dos 16%). Desta forma, poderá haver uma fracção de antagonista G associado aos SLG que não participa na associação celular dos SLG. No caso dos lipossomas vectorizados preparados pelo método de pós-inserção, a inserção dos conjugados de antagonista G-PEG-DSPE de maiores dimensões nos lipossomas pré-formados, diminui de forma acentuada ou elimina de todo a associação não específica do peptídeo aos lipossomas pré-formados. Em adição, os dados de associação celular demonstram que o antagonista G permanece funcionalmente activo mediante as condições utilizadas no método de pós-inserção. Assim, estes dados sugerem que a utilização da tecnologia de pós-inserção na preparação de lipossomas vectorizados por ligandos pode constituir uma forma eficaz de limitar a absorção não específica de ligandos aos lipossomas, em particular quando se trata de compostos hidrofóbicos. A extensão da técnica de pós-inserção para incorporar conjugados de antagonista G-PEG-DSPE confirmou a flexibilidade desta estratégia na preparação de lipossomas vectorizados por peptídeos biologicamente activos, como o antagonista G.

A capacidade dos lipossomas apresentarem tempos de circulação sanguínea prolongados constitui um dos aspectos cruciais inerentes à sua aplicação *in vivo*. Este factor aumenta a probabilidade dos lipossomas poderem atingir o tumor o que, aliado a um diâmetro médio aproximado de 100 nm, proporciona a extravasão dos lipossomas do compartimento vascular para o interstício tumoral (Papahadjopoulos *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1993; Gabizon *et al.*, 1994). A incorporação de PEG à superfície de lipossomas revelou-se decisiva para evitar uma rápida opsonização dos lipossomas com a consequente captura pelas células do sistema monocítico fagocitário (Allen *et al.*, 1991b; Woodle *et al.*, 1992b). No entanto, a presença de ligandos para vectorizar lipossomas é ela própria susceptível de influenciar a circulação sanguínea dos lipossomas com PEG (Allen *et al.*, 1995b; Goren *et al.*, 1996). No caso da utilização de anticorpos monoclonais, foi determinado que para densidades de anticorpo superiores a 70 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de fosfolípido (correspondente a 1 nmol de anticorpo monoclonal/ μmol de fosfolípido), os lipossomas são rapidamente eliminados da

corrente sanguínea (Allen *et al.*, 1995b). Neste contexto, e no seguimento dos resultados obtidos *in vitro* com os lipossomas vectorizados com o antagonista G preparados pelo método de acoplamento PDP-PEG-DSPE (capítulos 2 e 3), era importante avaliar a sua farmacocinética e biodistribuição, primeiramente, em animais sãos.

Dos resultados apresentados no capítulo 2, há a registar o facto dos lipossomas vectorizados com 1 µg de antagonista G/µmol de fosfolípido (correspondente a 1 nmol de antagonista G/µmol de fosfolípido), após administração intravenosa, apresentarem uma acentuada acumulação no baço. No entanto, segundo Litzinger *et al.* (1994), lipossomas com PEG e com uma gama de tamanhos entre 100 e 130 nm (correspondente ao intervalo dos valores de tamanho dos lipossomas usados nesta experiência) têm uma reduzida acumulação no fígado e no baço. Assim, é de considerar a hipótese da acumulação de SLG observada no baço ser devida à presença, neste órgão, de receptores da vasopressina (Elands *et al.*, 1990; Lolait *et al.*, 1995), para os quais, aliás, o antagonista G apresenta uma elevada afinidade (Woll e Rozengurt, 1990). Todavia, é de salientar que a cinética de eliminação para os SLG é dominada pela fase β de eliminação. Este perfil de eliminação é típico de uma formulação lipossómica com tempos de circulação sanguínea prolongados (tempo de semi-vida sanguíneo de 13 h), nomeadamente, quando comparado com o de formulações sem PEG, as quais são rapidamente removidas da circulação após administração intravenosa (Allen e Hansen, 1991).

Os estudos de biodistribuição realizados em ratinhos atímicos *Balb/c nude* com tumores subcutâneos resultantes da inoculação de células H69 (capítulo 5), confirmaram o padrão de acumulação ao nível do baço observado anteriormente, por parte dos lipossomas vectorizados pelo antagonista G. Nestas experiências, a acumulação tumoral de lipossomas revelou ser independente da presença do antagonista G. É de salientar o facto da utilização de metodologias de acoplamento diferentes (PDP-PEG-DSPE e MAL-PEG-DSPE), embora ambas resultando na formação de uma ligação tioéter, determinarem tamanhos diferentes de lipossomas vectorizados pelo antagonista G. A menor acumulação tumoral dos SLG_{PDP} relativamente aos SLG_{MAL} (cerca de 12 vezes inferior) está provavelmente relacionada com

o seu maior diâmetro médio e com a maior acumulação no baço (que resultará num menor número de lipossomas disponíveis na circulação para extravasarem para o tumor). Estes dados confirmam as observações registadas por outros autores, no que diz respeito ao facto da acumulação tumoral de lipossomas poder ser dependente do tamanho (Yuan *et al.*, 1995; Hobbs *et al.*, 1998) e ao facto da vectorização de lipossomas mediada por ligandos não determinar o aumento da acumulação dos lipossomas em tumores sólidos (Goren *et al.*, 1996; Maruyama *et al.*, 1997; Kirpotin *et al.*, 1998). Desta forma, a acumulação dos lipossomas vectorizados em tumores sólidos parece ser função do mesmo factor que regula a acumulação tumoral dos lipossomas não vectorizados, ou seja, extravasão por difusão passiva.

Para as mesmas quantidades de antagonista G acoplado (1 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de fosfolípido), os SLG_{MAL} não só apresentaram os mesmos níveis de acumulação tumoral dos lipossomas não vectorizados (entre 2 e 4 % da dose injectada/g de tecido), como também apresentaram os mesmos níveis de associação com as células H69 previamente registados com os SLG_{PDP} (capítulo 5).

No modelo animal de cancro humano de pequenas células do pulmão utilizado neste trabalho, as formulações lipossómicas apresentaram maior eficácia terapêutica do que o tratamento com a DXR livre, facto mais evidente quando se utilizaram as doses de 10 mg de DXR lipossómica/kg de peso corporal (em oposição às 6 mg de DXR livre/kg de peso corporal) e independentemente do estado de desenvolvimento tumoral. Embora estes resultados sejam reveladores do potencial de utilização dos lipossomas Stealth[®] de DXR (não vectorizados) no tratamento de tumores primários de cancro humano de pequenas células do pulmão, é de salientar a ausência de quaisquer diferenças entre os tratamentos efectuados com DXR-SL e DXR-SLG. Um resultado semelhante com lipossomas de DXR vectorizados com o anticorpo monoclonal N12A5 (anti-glicoproteína p185^{HER2}), num modelo de carcinoma gástrico, foi atribuído a uma possível ausência de internalização celular dos lipossomas vectorizados (Goren *et al.*, 1996). Os SLG, no entanto, como já

demonstrado, são internalizados pelas células H69, pelo que, a ausência de internalização celular não poderá explicar os resultados dos estudos terapêuticos apresentados neste capítulo.

Adicionalmente, estudos metabólicos e de actividade realizados com o antagonista G (Cummings *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1995b), sugerem que o peptídeo acoplado a lipossomas com PEG são susceptíveis de manter *in vivo* as suas propriedades de ligação aos receptores e que, desta maneira, outros factores, que não a ausência de ligação do peptídeo aos receptores celulares, estarão na base da actividade terapêutica semelhante entre a DXR-SL e a DXR-SLG.

Uma possível explicação poderá ser baseada na reduzida vascularização dos tumores subcutâneos H69. A análise histológica dos tumores subcutâneos H69 demonstraram que estes tumores são na realidade pouco vascularizados, confirmando assim observações macroscópicas. Esta aliás parece ser uma característica comum aos tumores subcutâneos de cancro humano de pequenas células do pulmão (Boerman *et al.*, 1991). Esta característica poderá limitar a quantidade de fármaco lipossómico que se acumula nos tumores, bem como, o seu nível de penetração no seio da massa tumoral.

A compreensão dos factores que determinam a ausência de diferenças entre a actividade terapêutica da DXR-SL e da DXR-SLG, constitui uma boa base para a realização de trabalho futuro. Assim sendo, é por exemplo importante efectuar uma análise comparativa da distribuição tumoral relativa entre as duas formulações e analisar como é que aquela distribuição se relaciona com a rede de vasos sanguíneos inerente aos tumores subcutâneos H69. Simultaneamente, será importante também testar a actividade da DXR-SLG em outro tipo de tumores subcutâneos que possam expressar receptores para o antagonista G, como as células de cancro da mama (North *et al.*, 1999), e mais vascularizados que os tumores subcutâneos utilizados neste trabalho.

Os sucessos anteriormente obtidos no tratamento de células tumorais no compartimento vascular (Lopes de Menezes *et al.*, 1998) ou no tratamento de lesões

metastáticas pulmonares recentes (Ahmad *et al.*, 1993; Moase *et al.*, 2001), sugerem que a eficácia dos lipossomas vectorizados pelo antagonista G deve ser avaliada na eliminação de células circulantes, num modelo animal metastático ou pseudometastático. Uma vez que o cancro humano de pequenas células do pulmão exhibe, de entre todos os tumores sólidos humanos, o potencial de metastização mais elevado (Moore *et al.*, 1998), os lipossomas de DXR vectorizados pelo antagonista G poderão ter um papel importante como terapia adjuvante contra as células metastáticas de cancro humano de pequenas células do pulmão circulantes no sangue. Para este efeito e como referido no capítulo 5, será necessário o desenvolvimento de um modelo animal apropriado para testar esta hipótese.

Indubitavelmente, no trabalho apresentado nesta dissertação ficou provado que uma molécula tão pequena quanto um hexapeptídeo (como o antagonista G), pode constituir uma *chave* de acesso ao espaço intracelular de células de cancro humano de pequenas células do pulmão. Em concreto, demonstrou-se que o antagonista G é susceptível de, *in vitro*, promover a ligação e a internalização de lipossomas estabilizados estereamente (e do correspondente material encapsulado) pelas células de cancro humano de pequenas células do pulmão. Espera-se que esta descoberta, a par do desenvolvimento de novas moléculas com actividade farmacológica, possa contribuir para a concepção de formas de tratamento mais eficazes de uma doença tão agressiva e incurável, como é ainda, o cancro humano de pequenas células do pulmão.



*Tese de Doutoramento
Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra
2001*

Referências bibliográficas

- Abra, R. M. e Hunt, C. A., Liposome disposition in vivo. III. Dose and vesicle-size effects. *Biochim. Biophys. Acta*, **666**, 493-503 (1981).
- Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N. C. e Davis, F. F., Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.*, **252**, 3578-3581 (1977).
- Adams, G. P., Schier, R., McCall, A. M., Simmons, H. H., Horak, E. M., Alpaugh, R. K., Marks, J. D. e Weiner, L. M., High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res.*, **61**, 4750-4755 (2001).
- Ahmad, I. e Allen, T. M., Antibody-mediated specific binding and cytotoxicity of liposome-entrapped doxorubicin to lung cancer cells in vitro. *Cancer Res.*, **52**, 4817-4820 (1992).
- Ahmad, I., Longenecker, M., Samuel, J. e Allen, T. M., Antibody-targeted delivery of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice. *Cancer Res.*, **53**, 1484-1488 (1993).
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Watson, J. D., Differentiated cells and the maintenance of tissues: new capillaries form by sprouting. *In: B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson (eds.), Molecular Biology of the Cell*, pp. 908-909, Garland Publishing, Inc., New York (1983a).
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Watson, J. D., The immune system: the immune system is ineffective against most tumors. *In: B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson (eds.), Molecular Biology of the Cell*, pp. 1006, Garland Publishing, Inc., New York (1983b).
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Watson, J. D., The immune system: the strength of an antibody-antigen interaction depends on both the affinity and the number of binding sites. *In: B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson (eds.), Molecular Biology of the Cell*, pp. 969-970, Garland Publishing, Inc., New York (1983c).
- Alberts, D. S. e Garcia, D. J., Safety aspects of pegylated liposomal doxorubicin in patients

- with cancer. *Drugs*, **54**, 30-35 (1997).
- Allen, T. M., Toxicity of drug carriers to the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2**, 55-67 (1988).
- Allen, T. M., StealthTM liposomes: avoiding reticuloendothelial uptake. In: G. Lopez Berenstein, I. J. Fidler (eds.), *Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer*, pp. 405-415, Alan R. Liss, Inc., New York (1989).
- Allen, T. M., The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **13**, 285-309 (1994).
- Allen, T. M., Liposomes. Opportunities in drug delivery. *Drugs*, **54**, 8-14 (1997).
- Allen, T. M., Agrawal, A. K., Ahmad, I., Hansen, C. B. e Zalipsky, S., Antibody-mediated targeting of long-circulating (Stealth[®]) liposomes. *J. Liposome Res.*, **4**, 1-25 (1994).
- Allen, T. M., Ahmad, I., Lopes de Menezes, D. E. e Moase, E. H., Immunoliposome-mediated targeting of anti-cancer drugs in vivo. *Biochem. Soc. Trans.*, **23**, 1073-1079 (1995a).
- Allen, T. M., Austin, G. A., Chonn, A., Lin, L. e Lee, K. C., Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim. Biophys. Acta*, **1061**, 56-64 (1991a).
- Allen, T. M., Brandeis, E., Hansen, C. B., Kao, G. Y. e Zalipsky, S., A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells [published erratum appears in *Biochim. Biophys. Acta* 1995 Dec 13;1240(2):285]. *Biochim. Biophys. Acta*, **1237**, 99-108 (1995b).
- Allen, T. M. e Chonn, A., Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.*, **223**, 42-46 (1987).
- Allen, T. M. e Cleland, L. G., Serum-induced leakage of liposome contents. *Biochim. Biophys. Acta*, **597**, 418-426 (1980).

- Allen, T. M. e Hansen, C., Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim. Biophys. Acta*, **1068**, 133-141 (1991).
- Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C. e Yau-Young, A., Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1066**, 29-36 (1991b).
- Allen, T. M., Hansen, C. e Rutledge, J., Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **981**, 27-35 (1989).
- Allen, T. M., Hansen, C. B. e Guo, L. S., Subcutaneous administration of liposomes: a comparison with the intravenous and intraperitoneal routes of injection. *Biochim. Biophys. Acta*, **1150**, 9-16 (1993).
- Allen, T. M., Mehra, T., Hansen, C. e Chin, Y. C., Stealth liposomes: an improved sustained release system for 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.*, **52**, 2431-2439 (1992).
- Allen, T. M. e Moase, E. H., Therapeutic opportunities for targeted liposomal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **21**, 117-133 (1996).
- Allen, T. M., Newman, M. S., Woodle, M. C., Mayhew, E. e Uster, P. S., Pharmacokinetics and anti-tumor activity of vincristine encapsulated in sterically stabilized liposomes. *Int. J. Cancer*, **62**, 199-204 (1995c).
- Allen, T. M., Ryan, J. L. e Papahadjopoulos, D., Gangliosides reduce leakage of aqueous-space markers from liposomes in the presence of human plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, **818**, 205-210 (1985).
- Allen, T. M., Williamson, P. e Schlegel, R. A., Phosphatidylserine as a determinant of reticuloendothelial recognition of liposome models of the erythrocyte surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8067-8071 (1988).
- Ansell, S. M., Kojic, L. D., Hankins, J. S., Sekirov, L., Boey, A., Lee, D. K., Bennett, A. R., Klimuk, S. K., Harasym, T. O., Santos, N. D. e Semple, S. C., Application

- of oligo-(14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanoic acid) lipid conjugates as steric barrier molecules in liposomal formulations. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 653-666 (1999).
- Azevedo, I., Citostáticos e imunodepressores. In: J. Garrett, W. Osswald (eds.), *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*. Vol. II, pp. 1190-1224, Porto Editora, Porto (1986).
- Bangham, A. D., Hill, M. W. e Miller, N. G. A., Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. In: E. D. Korn (ed.), *Methods in Membrane Biology*. Vol. I, pp. 1-68, Plenum Press, New York (1974).
- Bangham, A. D., Standish, M. M. e Watkins, J. C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252 (1965).
- Barbosa, C. M., Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossômicas de monofosfato de vidarabina para o tratamento da hepatite B crônica. Tese de Doutorado. *Faculdade de Farmácia*, pp. 288, Universidade do Porto, Porto (1995).
- Barenholz, Y. e Crommelin, D. J. A., Liposomes as pharmaceutical dosage forms. In: J. Swarbrick, J. C. Boylan (eds.), *Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms to Microencapsulation, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Vol. 9, pp. 1-39, Marcel Dekker, Inc., New York (1994).
- Bartlett, G. R., Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, **234**, 466-468 (1959).
- Bedu-Addo, F. K., Tang, P., Xu, Y. e Huang, L., Interaction of polyethyleneglycol-phospholipid conjugates with cholesterol-phosphatidylcholine mixtures: sterically stabilized liposome formulations. *Pharm. Res.*, **13**, 718-24 (1996).
- Bergin, C., O'Leary, A., McCreary, C., Sabra, K. e Mulcahy, F., Treatment of Kaposi's sarcoma with liposomal doxorubicin. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, **53**, 2001-2004 (1995).
- Blume, G. e Cevc, G., Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim.*

- Biophys. Acta*, **1029**, 91-97 (1990).
- Blume, G., Cevc, G., Crommelin, M. D., Bakker-Woudenberg, I. A., Kluft, C. e Storm, G., Specific targeting with poly(ethylene glycol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of the polymeric chains combines effective target binding with long circulation times. *Biochim. Biophys. Acta*, **1149**, 180-184 (1993).
- Boeckler, C., Dautel, D., Schelte, P., Frisch, B., Wachsmann, D., Klein, J. P. e Schuber, F., Design of highly immunogenic liposomal constructs combining structurally independent B cell and T helper cell peptide epitopes. *Eur. J. Immunol.*, **29**, 2297-2308 (1999).
- Boerman, O. C., Mijnheere, E. P., Broers, J. L., Vooijs, G. P. e Ramaekers, F. C., Biodistribution of a monoclonal antibody (RNL-1) against the neural cell adhesion molecule (NCAM) in athymic mice bearing human small-cell lung-cancer xenografts. *Int. J. Cancer*, **48**, 457-462 (1991).
- Bolotin, E. M., Cohen, R., Bar, L. K., Emanuel, N., Ninio, S., Lasic, D. D. e Barenholz, Y., Ammonium sulphate gradients for efficient and stable remote loading of amphipatic weak bases into liposomes and ligandoliposomes. *J. Liposome Res.*, **4**, 455-479 (1994).
- Boman, N. I., Mayer, L. D. e Cullis, P. R., Optimization of the retention properties of vincristine in liposomal systems. *Biochim. Biophys. Acta*, **1152**, 253-258 (1993).
- Brambilla, E., Moro, D., Gazzeri, S., Brichon, P. Y., Nagy-Mignotte, H., Morel, F., Jacrot, M. e Brambilla, C., Cytotoxic chemotherapy induces cell differentiation in small-cell lung carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **9**, 50-61 (1991).
- Brown, J. M. e Giaccia, A. J., The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.*, **58**, 1408-1416 (1998).
- Bunn, P. A., Jr., Chan, D., Dienhart, D. G., Tolley, R., Tagawa, M. e Jewett, P. B., Neuropeptide signal transduction in lung cancer: clinical implications of bradykinin sensitivity and overall heterogeneity. *Cancer Res.*, **52**, 24-31 (1992).
- Bunn, P. A., Jr., Chan, D., Stewart, J., Gera, L., Tolley, R., Jewett, P., Tagawa, M.,

- Alford, C., Mochzuki, T. e Yanaihara, N., Effects of neuropeptide analogues on calcium flux and proliferation in lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, **54**, 3602-3610 (1994).
- Carney, D. N., The biology of lung cancer: small cell and non-small cell. In: Alfred P. Fishman (ed.), *Pulmonary Diseases and Disorders*, pp. 1885-1898, McGraw Hill (1988).
- Cheng, P. W., Receptor ligand-facilitated gene transfer: enhancement of liposome-mediated gene transfer and expression by transferrin. *Hum. Gene Ther.*, **7**, 275-282 (1996).
- Cheung, B. C., Sun, T. H., Leenhouts, J. M. e Cullis, P. R., Loading of doxorubicin into liposomes by forming Mn²⁺-drug complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1414**, 205-216 (1998).
- Clemons, K. V. e Stevens, D. A., Therapeutic efficacy of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) against murine blastomycosis. *J. Antimicrob. Chemoth.*, **32**, 465-472 (1993).
- Clerc, S. e Barenholz, Y., Loading of amphipathic weak acids into liposomes in response to transmembrane calcium acetate gradients. *Biochim. Biophys. Acta*, **1240**, 257-265 (1995).
- Comis, R. L., Friedland, D. M. e Good, B. C., Small-cell lung cancer: a perspective on the past and a preview of the future. *Oncol.*, **12**, 44-50 (1998).
- Compagnon, B., Milhaud, P., Bienvenue, A. e Philippot, J. R., Targeting of poly(rI)-poly(rC) by fusogenic (F protein) immunoliposomes. *Exp. Cell Res.*, **200**, 333-338 (1992).
- Cook, R. M., Miller, Y. E. e Bunn, P. A., Small cell lung cancer: etiology, biology, clinical features, staging, and treatment. *Curr. Probl. Cancer*, **XVII**, 71-141 (1993).
- Corvo, M. L., Liposomes as delivery system for superoxide dismutase in experimental arthritis. Ph. D. Thesis. *Faculty of Pharmacy*, pp. 173, Utrecht University, Utrecht (1998).

- Cummings, J., MacLellan, A. J., Jones, D. A., Langdon, S. P., Rozengurt, E., Ritchie, A. A. e Smyth, J. F., Pharmacokinetics, metabolism, tissue and tumour distribution of the neuropeptide growth factor antagonist [Arg⁶, D-Trp^{7,9}, N^{me}Phe⁸]- substance P(6-11) in nude mice bearing the H69 small-cell lung cancer xenograft. *Ann. Oncol.*, **6**, 595-602 (1995).
- Daemen, T., De Haan, A., Arkema, A. e Wilschut, J., Liposomes and virosomes as immunoadjuvant and antigen-carrier systems in vaccine formulations. *In: D. D. Lasic, D. Papahadjopoulos (eds.), Medical Applications of Liposomes*, pp. 117-144, Elsevier Science B. V., Amsterdam (1998).
- Daleke, D. L., Hong, K. e Papahadjopoulos, D., Endocytosis of liposomes by macrophages: binding, acidification and leakage of liposomes monitored by a new fluorescence assay. *Biochim. Biophys. Acta*, **1024**, 352-366 (1990).
- DeFrees, S. A., Phillips, L., Guo, L. e Zalipsky, S., Sialyl Lewis x liposomes as a multivalent ligand and inhibitor of E-selectin mediated cellular adhesion. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6101-6104 (1996).
- Defrise-Quertain, F., Chatelain, P., Delmelle, M. e Ruyschaert, J. M., Model studies for drug entrapment and liposomes stability. *In: G. Gregoriadis (ed.), Liposome Technology*. Vol. II, pp. 1-17, CRC Press, Inc., Boca Raton (1984).
- Devine, D. V. e Marjan, J. M., The role of immunoproteins in the survival of liposomes in the circulation. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **14**, 105-131 (1997).
- Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. B. e Papahadjopoulos, D., Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.*, **51**, 691-743 (1999).
- Eavarone, D. A., Yu, X. e Bellamkonda, R. V., Targeted drug delivery to C6 glioma by transferrin-coupled liposomes. *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 10-14 (2000).
- Elands, J., Resink, A. e De Kloet, E. R., Neurohypophyseal hormone receptors in the rat thymus, spleen, and lymphocytes. *Endocrinology*, **126**, 2703-2710 (1990).
- Fay, M. J., Friedmann, A. S., Yu, X. M. e North, W. G., Vasopressin and vasopressin-

- receptor immunoreactivity in small-cell lung carcinoma (SCCL) cell lines: disruption in the activation cascade of V_{1a}-receptors in variant SCCL. *Cancer Lett.*, **82**, 167-174 (1994).
- Fidler, I. J., Fan, D. e Ichinose, Y., Potent in situ activation of murine lung macrophages and therapy of melanoma metastases by systemic administration of liposomes containing muramyltripeptide phosphatidylethanolamine and interferon gamma. *Invasion Metastasis*, **9**, 75-88 (1989).
- Fidler, I. J., Nayar, R. e Schroit, A., Systemic macrophage activation with liposome-entrapped immunomodulators. In: G. Gregoriadis (ed.), *Liposomes as Drug Carriers. Recent Trends and Progress.*, pp. 115-129, John Wiley and Sons, Ltd., New York (1988).
- Forsen, E. e Willis, M., Ligand-targeted liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **29**, 249-271 (1998).
- Forsen, E. A., The design and development of DaunoXome[®] for solid tumor targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **24**, 133-150 (1997).
- Forsen, E. A., Coulter, D. M. e Proffitt, R. T., Selective in vivo localization of daunorubicin small unilamellar vesicles in solid tumors. *Cancer Res.*, **52**, 3255-3261 (1992).
- Forsen, E. A., Male-Brune, R., Adler-Moore, J. P., Lee, M. J., Schmidt, P. G., Krasieva, T. B., Shimizu, S. e Tromberg, B. J., Fluorescence imaging studies for the disposition of daunorubicin liposomes (DaunoXome) within tumor tissue. *Cancer Res.*, **56**, 2066-2075 (1996).
- Freise, J., Mueller, W. H., Magerstedt, P. e Schmoll, H. J., Pharmacokinetics of liposome encapsulated cisplatin in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **258**, 180-192 (1982).
- Friede, M., Muller, S., Briand, J. P., Van Regenmortel, M. H. e Schuber, F., Induction of immune response against a short synthetic peptide antigen coupled to small neutral liposomes containing monophosphoryl lipid A. *Mol. Immunol.*, **30**, 539-547 (1993).

- Fujiwara, K., Motomi, Y. e Kitagawa, T., Novel preparation method of immunogen for hydrophobic hapten, enzyme immunoassay for daunomycin and adriamycin. *J. Immunol. Methods*, **45**, 195-203 (1981).
- Gaber, M. H., Hong, K., Huang, S. K. e Papahadjopoulos, D., Thermosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and in vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma. *Pharm. Res.*, **12**, 1407-1416 (1995).
- Gabizon, A., Barenholz, Y. e Bialer, M., Prolongation of the circulation time of doxorubicin encapsulated in liposomes containing a polyethylene glycol-derivatized phospholipid: pharmacokinetic studies in rodents and dogs. *Pharm. Res.*, **10**, 703-708 (1993).
- Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A. e Barenholz, Y., Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res.*, **54**, 987-992 (1994).
- Gabizon, A., Horowitz, A. T., Goren, D., Tzemach, D., Mandelbaum-Shavit, F., Qazen, M. M. e Zalipsky, S., Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: in vitro studies. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 289-298 (1999).
- Gabizon, A. e Papahadjopoulos, D., Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6949-6953 (1988).
- Gabizon, A. e Papahadjopoulos, D., The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1103**, 94-100 (1992).
- Gabizon, A., Price, D. C., Huberty, J., Bresalier, R. S. e Papahadjopoulos, D., Effect of liposome composition and other factors on the targeting of liposomes to experimental tumors: biodistribution and imaging studies. *Cancer Res.*, **50**, 6371-6378 (1990).
- Gazdar, A. F., Carney, D. N., Nau, M. M. e Minna, J. D., Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res.*, **45**, 2924-2930 (1985).

- Gelmon, K. A., Tolcher, A., Diab, A. R., Bally, M. B., Embree, L., Hudon, N., Dedhar, C., Ayers, D., Eisen, A., Melosky, B., Burge, C., Logan, P. e Mayer, L. D., Phase I study of liposomal vincristine. *J. Clin. Oncol.*, **17**, 697-705 (1999).
- Gill, P. S., Espina, B. M., Muggia, F., Cabriales, S., Tulpule, A., Esplin, J. A., Liebman, H. A., Forssen, E., Ross, M. E. e Levine, A. M., Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *J. Clin. Oncol.*, **13**, 996-1003 (1995).
- Gordon, A. N., Granai, C. O., Rose, P. G., Hainsworth, J., Lopez, A., Weissman, C., Rosales, R. e Sharpington, T., Phase II study of liposomal doxorubicin in platinum- and paclitaxel-refractory epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.*, **18**, 3093-3100 (2000).
- Goren, D., Horowitz, A. T., Tzemach, D., Tarshish, M., Zalipsky, S. e Gabizon, A., Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 1949-1957 (2000).
- Goren, D., Horowitz, A. T., Zalipsky, S., Woodle, M. C., Yarden, Y. e Gabizon, A., Targeting of stealth liposomes to erbB-2 (Her/2) receptor: in vitro and in vivo studies. *Br. J. Cancer*, **74**, 1749-1756 (1996).
- Gregoriadis, D. e Davis, C., Stability of liposomes in vivo and in vitro is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1287-1293 (1979).
- Gregoriadis, G., Drug entrapment in liposomes. *FEBS Lett.*, **36**, 292-296 (1973).
- Gregoriadis, G., The carrier potential of liposomes in biology and medicine (First of two parts). *New Engl. J. Med.*, **295**, 704-710 (1976a).
- Gregoriadis, G., The carrier potential of liposomes in biology and medicine (Second of two parts). *New Engl. J. Med.*, **295**, 765-770 (1976b).
- Gregoriadis, G. (ed.), *Liposome Preparation and Related Techniques*, 2nd ed., CRC Press, Inc., Boca Raton (1993).

- Hande, K. R., Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**, 173-184 (1998).
- Hanna, N., The role of natural killer cells in the control of tumor growth and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*, **780**, 213-226 (1985).
- Hansen, C. B., Kao, G. Y., Moase, E. H., Zalipsky, S. e Allen, T. M., Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochim. Biophys. Acta*, **1239**, 133-144 (1995).
- Haran, G., Cohen, R., Bar, L. K. e Barenholz, Y., Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases [published erratum appears in *Biochim Biophys Acta* 1994 Feb 23;1190(1):197]. *Biochim. Biophys. Acta*, **1151**, 201-215 (1993).
- Harasym, T. O., Bally, M. B. e Tardi, P., Clearance properties of liposomes involving conjugated proteins for targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**, 99-118 (1998).
- Harding, J. A., Engbers, C. M., Newman, M. S., Goldstein, N. I. e Zalipsky, S., Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1327**, 181-192 (1997).
- Harrington, K. J., Lewanski, C. R. e Stewart, J. S., Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 1: preclinical development. *Clin. Oncol.*, **12**, 2-15 (2000a).
- Harrington, K. J., Lewanski, C. R. e Stewart, J. S., Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 2: clinical development. *Clin. Oncol.*, **12**, 16-24 (2000b).
- Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J. W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R. K. e McDonald, D. M., Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.*, **156**, 1363-1380 (2000).
- Heath, T. D., Lopez, N. G. e Papahadjopoulos, D., The effects of liposome size and surface charge on liposome-mediated delivery of methotrexate-gamma-aspartate to cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **820**, 74-84 (1985).

- Heimbrook, D. C., Saari, W. S., Balishin, N. L., Friedman, A., Moore, K. S., Reimen, M. W., Kiefer, D. M., Rotberg, N. S., Wallen, J. W. e Oliff, A., Carboxyl-terminal modification of a gastrin releasing peptide derivative generates potent antagonists. *J. Biol. Chem.*, **264**, 11258-11262 (1989).
- Hermanson, G. T., Introduction of sulfhydryl residues (thiolation): modification of amines with 2-iminothiolane (Traut's reagent). *In: G. T. Hermanson (ed.), Bioconjugate Techniques*, pp. 56-60, Academic Press, Inc., San Diego (1996a).
- Hermanson, G. T., Tags and probes: iodination reagents. *In: G. T. Hermanson (ed.), Bioconjugate Techniques*, pp. 400-416, Academic Press, Inc., San Diego (1996b).
- Hermanson, G. T., Zero-length cross-linkers: EDC plus sulfo-NHS. *In: G. T. Hermanson (ed.), Bioconjugate Techniques*, pp. 173-176, Academic Press, Inc., San Diego (1996c).
- Heuser, J. E. e Anderson, R. G., Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.*, **108**, 389-400 (1989).
- Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P. e Jain, R. K., Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4607-4612 (1998).
- Hoche, B., Merker, H. J., Durr, J. A., Schiller, S., Gross, P. e Hensen, J., Internalization of V2-vasopressin receptors in LLC-PK1-cells: evidence for receptor-mediated endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 1376-1383 (1992).
- Hope, M. J., Bally, M. B., Mayer, L. D., Janoff, A. S. e Cullis, P. R., Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 89-107 (1986).
- Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G. e Cullis, P. R., Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 55-65 (1985).
- Horowitz, A. T., Barenholz, Y. e Gabizon, A. A., In vitro cytotoxicity of liposome-

- encapsulated doxorubicin: dependence on liposome composition and drug release. *Biochim. Biophys. Acta*, **1109**, 203-209 (1992).
- Hristova, K., Kenworthy, A. e McIntosh, T. J., Effect of bilayer composition on the phase behavior of liposomal suspensions containing poly(ethylene glycol)-lipids. *Macromolecules*, **28**, 7693-7699 (1995).
- Hunt, C. A., Rustum, Y. M., Mayhew, E. e Papahadjopoulos, D., Retention of cytosine arabinoside in mouse lung following intravenous administration in liposomes of different size. *Drug Metab. Dispos.*, **7**, 124-128 (1979).
- Huwyler, J., Wu, D. e Pardridge, W. M., Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14164-14169 (1996).
- Huwyler, J., Yang, J. e Pardridge, W. M., Receptor mediated delivery of daunomycin using immunoliposomes: pharmacokinetics and tissue distribution in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 1541-1546 (1997).
- Ihde, D. C., Pass, H. I. e Glatstein, E., Small cell lung cancer. In: V. T. DeVita, S. Hellman, S. A. Rosenberg (eds.), *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, pp. 911-949, Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, New York (1997).
- Innamorati, G., Sadeghi, H. e Birnbaumer, M., Transient phosphorylation of the V1a vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 7155-7161 (1998a).
- Innamorati, G., Sadeghi, H. M., Tran, N. T. e Birnbaumer, M., A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2222-2226 (1998b).
- Ishida, O., Maruyama, K., Tanahashi, H., Iwatsuru, M., Sasaki, K., Eriguchi, M. e Yanagie, H., Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo. *Pharm. Res.*, **18**, 1042-1048 (2001).
- Ishida, T., Iden, D. L. e Allen, T. M., A combinatorial approach to producing sterically stabilized (Stealth) immunoliposomal drugs. *FEBS Lett.*, **460**, 129-133 (1999).

- Janknegt, R., de Marie, S., Bakker-Woudenberg, I. A. e Crommelin, D. J., Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. Clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.*, **23**, 279-291 (1992).
- Johnson, B. E. e Minna, J. D., Small cell lung cancer. In: Alfred P. Fishman (ed.), *Pulmonary Diseases and Disorders*, pp. 1971-1982, McGraw Hill (1988).
- Jones, D. A., Cummings, J., Langdon, S. P., Maclellan, A. e Smyth, J. F., Characterization of the deamidase enzyme responsible for the metabolism of the anticancer peptide - H-Arg-D-Trp-N^{me}Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 585-590 (1995a).
- Jones, D. A., Cummings, J., Langdon, S. P., MacLellan, A. J., Higgins, T., Rozengurt, E. e Smyth, J. F., Metabolism of the anticancer peptide H-Arg-D-Trp-N^{me}Phe-D-Trp-Leu-Met-NH₂. *Peptides*, **16**, 777-783 (1995b).
- Jones, D. A., Cummings, J., Langdon, S. P. e Smyth, J. F., Preclinical studies on the broad-spectrum neuropeptide growth factor antagonist G. *Gen. Pharmacol.*, **28**, 183-189 (1997).
- Jonkman-de Vries, J. D., Rosing, H., Talsma, H., Henrar, R. E., Kettenes-van den Bosch, J. J., Bult, A. e Beijnen, J. H., Pharmaceutical development of a parenteral lyophilized formulation of the investigational antitumor neuropeptide antagonist [Arg⁶, D-Trp^{7,9}, MePhe⁸]-Substance P [6-11]. *Invest. New Drugs*, **16**, 99-111 (1998).
- Juliano, R. L. e Stamp, D., Pharmacokinetics of liposome-encapsulated anti-tumor drugs. Studies with vinblastine, actinomycin D, cytosine arabinoside, and daunomycin. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 21-27 (1978).
- Juweid, M., Neumann, R., Paik, C., Perez-Bacete, M. J., Sato, J., van Osdol, W. e Weinstein, J. N., Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: direct experimental evidence for a binding site barrier. *Cancer Res.*, **52**, 5144-5153 (1992).
- Kastan, M. B., Molecular biology of cancer: the cell cycle. In: V. T. DeVita, S. Hellman, S. A. Rosenberg (eds.), *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, pp. 121-134,

- Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, New York (1997).
- Key, M. E., Talmadge, J. E., Fogler, W. E., Bucana, C. e Fidler, I. J., Isolation of tumoricidal macrophages from lung melanoma metastases of mice treated systemically with liposomes containing a lipophilic derivative of muramyl dipeptide. *J. Natl. Cancer Inst.*, **69**, 1189-1198 (1982).
- Kirby, C., Clarke, J. e Gregoriadis, G., Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem. J.*, **186**, 591-598 (1980).
- Kirchmeier, M. J., Ishida, T., Chevrette, J. e Allen, T. M., Correlations between the rate of intracellular release of endocytosed liposomal doxorubicin and cytotoxicity as determined by a new assay. *J. Liposome Res.*, **11**, 15-29 (2001).
- Kirpotin, D., Park, J. W., Hong, K., Shao, Y., Colbern, G., Zheng, W. W., Meyer, O., Benz, C. C. e Papahadjopoulos, D., Targeting of sterically stabilized liposomes to cancers overexpressing HER2/neu proto-oncogene. In: D. D. Lasic, D. Papahadjopoulos (eds.), *Medical Applications of Liposomes*, pp. 325-345, Elsevier Science B. V., Amsterdam (1998).
- Kirpotin, D., Park, J. W., Hong, K., Zalipsky, S., Li, W. L., Carter, P., Benz, C. C. e Papahadjopoulos, D., Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry*, **36**, 66-75 (1997).
- Klibanov, A. L., Maruyama, K., Beckerleg, A. M., Torchilin, V. P. e Huang, L., Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 142-148 (1991).
- Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. e Huang, L., Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.*, **268**, 235-237 (1990).
- Kole, L., Sakar, K., Mahato, S. B. e Das, P. K., Neoglycoprotein conjugated liposomes as macrophage specific drug carrier in the therapy of leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 351-358 (1994).

- Koning, G. A., Gorter, A., Scherphof, G. L. e Kamps, J. A., Antiproliferative effect of immunoliposomes containing 5-fluorodeoxyuridine-dipalmitate on colon cancer cells. *Br. J. Cancer*, **80**, 1718-1725 (1999a).
- Koning, G. A., Morselt, H. W., Velinova, M. J., Donga, J., Gorter, A., Allen, T. M., Zalipsky, S., Kamps, J. A. e Scherphof, G. L., Selective transfer of a lipophilic prodrug of 5-fluorodeoxyuridine from immunoliposomes to colon cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1420**, 153-167 (1999b).
- Koukourakis, M. I., Koukouraki, S., Giatromanolaki, A., Archimandritis, S. C., Skarlatos, J., Beroukas, K., Bizakis, J. G., Retalis, G., Karkavitsas, N. e Helidonis, E. S., Liposomal doxorubicin and conventionally fractionated radiotherapy in the treatment of locally advanced non-small-cell lung cancer and head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.*, **17**, 3512-3521 (1999).
- Krause, W., Klopp, R., Leike, A. e Schuhmann-Giampieri, Liposomes in diagnostic imaging. Comparison of modalities. In vivo visualization of liposomes. *J. Liposome Res.*, **5**, 1-26 (1995).
- Kuo, T. H., Kubota, T., Watanabe, M., Furukawa, T., Kase, S., Tanino, H., Nishibori, H., Saikawa, Y., Teramoto, T., Ishibiki, K., Kitajima, M. e Hoffman, R. M., Orthotopic reconstitution of human small-cell lung carcinoma after intravenous transplantation in SCID mice. *Anticancer Res.*, **12**, 1407-1410 (1992).
- Kuo, T. H., Kubota, T., Watanabe, M., Furukawa, T., Kase, S., Tanino, H., Saikawa, Y., Ishibiki, K., Kitajima, M. e Hoffman, R. M., Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: the importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data. *Anticancer Res.*, **13**, 627-630 (1993).
- Langdon, S., Sethi, T., Ritchie, A., Muir, M., Smyth, J. e Rozengurt, E., Broad spectrum neuropeptide antagonists inhibit the growth of small cell lung cancer in vivo. *Cancer Res.*, **52**, 4554-4557 (1992).
- Lasic, D. D., The mechanism of vesicle formation [published erratum appears in *Biochem J* 1989 Mar 15;258(3):following 933]. *Biochem J*, **256**, 1-11 (1988).

- Lasic, D. D., Liposomes. Synthetic lipid microspheres serve as multipurpose vehicles for the delivery of drugs, genetic material and cosmetics. *Am. Sci.*, **80**, 20-31 (1992).
- Lasic, D. D., Chemistry of lipids and liposomes. In: D. D. Lasic (ed.), *Liposomes: from Physics to Applications*, pp. 9-42, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1993a).
- Lasic, D. D., Introduction. In: D. D. Lasic (ed.), *Liposomes: from Physics to Applications*, pp. 3-7, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1993b).
- Lasic, D. D., Mechanism of liposome formation. In: D. D. Lasic (ed.), *Liposomes: from Physics to Applications*, pp. 109-154, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1993c).
- Lasic, D. D., Preparation of liposomes. In: D. D. Lasic (ed.), *Liposomes: from Physics to Applications*, pp. 63-108, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1993d).
- Lasic, D. D., Structure of amphiphilic aggregates. In: D. D. Lasic (ed.), *Liposomes: from Physics to Applications*, pp. 43-62, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1993e).
- Lasic, D. D., Doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Nature*, **380**, 561-562 (1996).
- Lasic, D. D., Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.*, **16**, 307-321 (1998).
- Lasic, D. D., Ceh, B., Stuart, M. C., Guo, L., Frederik, P. M. e Barenholz, Y., Transmembrane gradient driven phase transitions within vesicles: lessons for drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta*, **1239**, 145-156 (1995).
- Lasic, D. D., Frederik, P. M., Stuart, M. C., Barenholz, Y. e McIntosh, T. J., Gelation of liposome interior. A novel method for drug encapsulation. *FEBS Lett.*, **312**, 255-258 (1992).
- Lasic, D. D., Martin, F. J., Gabizon, A., Huang, S. K. e Papahadjopoulos, D., Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 187-192 (1991).

- Lee, K. D., Hong, K. e Papahadjopoulos, D., Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *Biochim. Biophys. Acta*, **1103**, 185-197 (1992).
- Lee, K. D., Nir, S. e Papahadjopoulos, D., Quantitative analysis of liposome-cell interactions in vitro: rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes. *Biochemistry*, **32**, 889-899 (1993).
- Lee, R. J. e Huang, L., Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8481-8487 (1996).
- Lee, R. J. e Low, P. S., Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3198-3204 (1994).
- Lee, R. J. e Low, P. S., Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **1233**, 134-144 (1995).
- Levitt, G., Cardioprotection. *Br. J. Haematol.*, **106**, 860-869 (1999).
- Litzinger, D. C., Buiting, A. M., van Rooijen, N. e Huang, L., Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1190**, 99-107 (1994).
- Litzinger, D. C. e Huang, L., Amphipathic poly(ethylene glycol) 5000-stabilized dioleoylphosphatidylethanolamine liposomes accumulate in spleen. *Biochim. Biophys. Acta*, **1127**, 249-254 (1992).
- Liu, D., Liu, F. e Song, Y. K., Monosialoganglioside GM1 shortens the blood circulation time of liposomes in rats. *Pharm. Res.*, **12**, 508-512 (1995a).
- Liu, D., Mori, A. e Huang, L., Large liposomes containing ganglioside GM1 accumulate effectively in spleen. *Biochim. Biophys. Acta*, **1066**, 159-165 (1991).
- Liu, D., Mori, A. e Huang, L., Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM₁-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1104**, 95-101 (1992).

- Liu, D., Song, Y. K. e Liu, F., Antibody dependent, complement mediated liver uptake of liposomes containing GM₁. *Pharm. Res.*, **12**, 1775-1780 (1995b).
- Lolait, S. J., O'Carroll, A. M., Mahan, L. C., Felder, C. C., Button, D. C., Young III, W. S., Mezey, E. e Brownstein, M. J., Extrahipituitary expression of the rat V1b vasopressin receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6783-6787 (1995).
- Lopes de Menezes, D. E., Kirchmeier, M. J., Gagne, J. F., Pilarski, L. M. e Allen, T. M., Cellular trafficking and cytotoxicity of anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin in B lymphoma cells. *J. Liposome Res.*, **9**, 199-228 (1999).
- Lopes de Menezes, D. E., Pilarski, L. M. e Allen, T. M., In vitro and in vivo targeting of immunoliposomal doxorubicin to human B-cell lymphoma. *Cancer Res.*, **58**, 3320-3330 (1998).
- Lopes de Menezes, D. E., Pilarski, L. M., Belch, A. R. e Allen, T. M., Selective targeting of immunoliposomal doxorubicin against human multiple myeloma in vitro and ex vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1466**, 205-220 (2000).
- Lopez-Berestein, G., Milas, L., Hunter, N., Mehta, K., Hersh, E. M., Kurahara, C. G., Vandupras, M. e Eppstein, D. A., Prophylaxis and treatment of experimental lung metastases in mice after treatment with liposome-encapsulated 6-O-stearoyl-N-acetylmuramyl-L-alpha-aminobutyryl-D-isoglutamine. *Clin. Exp. Metastasis*, **2**, 127-137 (1984).
- Lutz, W., Londowski, J. M., Sanders, M., Salisbury, J. e Kumar, R., A vasopressin analog that binds but does not activate V1 or V2 vasopressin receptors is not internalized into cells that express V1 or V2 receptors. *J. Biol. Chem.*, **267**, 1109-1115 (1992).
- Lutz, W., Sanders, M., Salisbury, J., Lolait, S., O'Carroll, A. M. e Kumar, R., Vasopressin receptor-mediated endocytosis in cells transfected with V1-type vasopressin receptors. *Kidney Int.*, **43**, 845-852 (1993).
- MacKinnon, A. C., Armstrong, R. A., Waters, C. M., Cummings, J., Smyth, J. F., Haslett, C. e Sethi, T., [Arg⁶,D-Trp^{7,9},N^{me}Phe⁸]-substance P (6-11) activates JNK

- and induces apoptosis in small cell lung cancer cells via an oxidant-dependent mechanism. *Br. J. Cancer*, **80**, 1026-1034 (1999).
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. e Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release*, **65**, 271-284 (2000).
- Mahmoud, S., Staley, J., Taylor, J., Bogden, A., Moreau, J. P., Coy, D., Avis, I., Cuttitta, F., Mulshine, J. L. e Moody, T. W., [$\text{Psi}^{13,14}$] bombesin analogues inhibit growth of small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, **51**, 1798-1802 (1991).
- Marjan, J. e Allen, T. M., Long circulating liposomes: past, present and future. *Biotechnol. Adv.*, **14**, 151-175 (1996).
- Martin, F. J. e Papahadjopoulos, D., Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. *J. Biol. Chem.*, **257**, 286-288 (1982).
- Maruyama, K., Okamoto, A., Kojima, S., Suginaka, A. e Iwatsuru, M., Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol). *Biochim. Biophys. Acta*, **1128**, 44-49 (1992).
- Maruyama, K., Takahashi, N., Tagawa, T., Nagaike, K. e Iwatsuru, M., Immunoliposomes bearing polyethyleneglycol-coupled Fab' fragment show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors in vivo. *FEBS Lett.*, **413**, 177-180 (1997).
- Maruyama, K., Takizawa, T., Yuda, T., Kennel, S. J., Huang, L. e Iwatsuru, M., Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1234**, 74-80 (1995).
- Mastrobattista, E., Koning, G. A. e Storm, G., Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 103-127 (1999a).

- Mastrobattista, E., Storm, G., van Bloois, L., Reszka, R., Bloemen, P. G., Crommelin, D. J. e Henricks, P. A., Cellular uptake of liposomes targeted to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on bronchial epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1419**, 353-363 (1999b).
- Matsui, H., Johnson, L. G., Randell, S. H. e Boucher, R. C., Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 1117-1126 (1997).
- Matthay, K. K., Abai, A. M., Cobb, S., Hong, K., Papahadjopoulos, D. e Straubinger, R. M., Role of ligand in antibody-directed endocytosis of liposomes by human T-leukemia cells. *Cancer Res.*, **49**, 4879-4886 (1989).
- Mayer, L. D., Tai, L. C., Bally, M. B., Mitilenes, G. N., Ginsberg, R. S. e Cullis, P. R., Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients. *Biochim. Biophys. Acta*, **1025**, 143-151 (1990).
- Mayer, L. D., Tai, L. C., Ko, D. S., Masin, D., Ginsberg, R. S., Cullis, P. R. e Bally, M. B., Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice. *Cancer Res.*, **49**, 5922-59230 (1989).
- Moase, E. H., Qi, W., Ishida, T., Gabos, Z., Longenecker, B. M., Zimmermann, G. L., Ding, L., Krantz, M. e Allen, T. M., Anti-MUC-1 immunoliposomal doxorubicin in the treatment of murine models of metastatic breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1510**, 43-55 (2001).
- Montaldo, P. G., Pagnan, G., Pastorino, F., Chiesa, V., Raffaghello, L., Kirchmeier, M., Allen, T. M. e Ponzoni, M., N-(4-hydroxyphenyl) retinamide is cytotoxic to melanoma cells in vitro through induction of programmed cell death. *Int. J. Cancer*, **81**, 262-267 (1999a).
- Montaldo, P. G., Pagnan, G., Raffaghello, L., Pastorino, F., Allen, T. M., Kirchmeier, M. e Ponzoni, M., Anti GD2-immunoliposome-mediated targeting of [¹²⁵I] metaiodobenzylguanidine to neuroblastoma and melanoma cells in vitro. *J. Liposome Res.*, **9**, 367-385 (1999b).

- Monteiro, J. G., Alguns parâmetros farmacocinéticos. In: J. Garrett, W. Osswald (eds.), *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*. Vol. I, pp. 48-55, Porto Editora, Porto (1986).
- Moody, T. W., Venugopal, R., Zia, F., Patierno, S., Leban, J. J. e McDermed, J., BW2258U89: a GRP receptor antagonist which inhibits small cell lung cancer growth. *Life Sci.*, **56**, 521-529 (1995).
- Moore, S. M., Rintoul, R. C., Walker, T. R., Chilvers, E. R., Haslett, C. e Sethi, T., The presence of a constitutively active phosphoinositide 3-kinase in small cell lung cancer cells mediates anchorage-independent proliferation via a protein kinase B and p70^{s6k}-dependent pathway. *Cancer Res.*, **58**, 5239-5247 (1998).
- Moreira, J. N., Caracterização de lipossomas de carboplatina revestidos com O-palmitoilpululano. Tese de Mestrado. *Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia*, pp. 122, Universidade de Coimbra, Coimbra (1994).
- Mori, A., Kennel, S. J., van Borssum Waalkes, M., Scherphof, G. L. e Huang, L., Characterization of organ-specific immunoliposomes for delivery of 3',5'-O-dipalmitoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine in a mouse lung-metastasis model. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **35**, 447-456 (1995).
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
- Mueller, B. M. e Reisfeld, R. A., Potential of the scid mouse as a host for human tumors. *Cancer Metastasis Rev.*, **10**, 193-200 (1991).
- Muggia, F. M., Hainsworth, J. D., Jeffers, S., Miller, P., Groshen, S., Tan, M., Roman, L., Uziely, B., Muderspach, L., Garcia, A., Burnett, A., Greco, F. A., Morrow, C. P., Paradiso, L. J. e Liang, L. J., Phase II study of liposomal doxorubicin in refractory ovarian cancer: antitumor activity and toxicity modification by liposomal encapsulation. *J. Clin. Oncol.*, **15**, 987-993 (1997).
- Nässander, U. K., Steerenberg, P. A., De Jong, W. H., Van Overveld, W. O., Te Boekhorst, C. M., Poels, L. G., Jap, P. H. e Storm, G., Design of immunoliposomes directed against human ovarian carcinoma. *Biochim. Biophys.*

- Acta*, **1235**, 126-139 (1995).
- Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G. e Dewhirst, M. W., A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res.*, **60**, 1197-1201 (2000).
- Needham, D., McIntosh, T. J. e Lasic, D. D., Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1108**, 40-48 (1992).
- New, R. R. C., Characterization of liposomes. In: R. R. C. New (ed.), *Liposomes: a Practical Approach, Practical Approach Series*, pp. 105-161, Oxford University Press, Oxford (1990a).
- New, R. R. C., Introduction. In: R. R. C. New (ed.), *Liposomes: a Practical Approach, Practical Approach Series*, pp. 1-32, Oxford University Press, Oxford (1990b).
- New, R. R. C., Preparation of liposomes. In: R. R. C. New (ed.), *Liposomes: a Practical Approach, Practical Approach Series*, pp. 33-104, Oxford University Press, Oxford (1990c).
- New, R. R. C., Influence of liposome characteristics on their properties and fate. In: J. R. Philippot, F. Schuber (eds.), *Liposomes as Tools in Basic Research and Industry*, CRC Press, Boca Raton (1995).
- North, W. G., Fay, M. J. e Du, J., MCF-7 breast cancer cells express normal forms of all vasopressin receptors plus an abnormal V2R. *Peptides*, **20**, 837-842 (1999).
- North, W. G., Fay, M. J., Longo, K. e Du, J. L., Functional vasopressin V₁ type receptors are present in variant as well as classical forms of small-cell carcinoma. *Peptides*, **18**, 985-993 (1997).
- North, W. G., Fay, M. J., Longo, K. A. e Du, J., Expression of all known vasopressin receptor subtypes by small cell tumors implies a multifaceted role for this neuropeptide. *Cancer Res.*, **58**, 1866-1871 (1998).
- Northfelt, D. W., Dezube, B. J., Thommes, J. A., Miller, B. J., Fischl, M. A., Friedman-

- Kien, A., Kaplan, L. D., Du Mond, C., Mamelok, R. D. e Henry, D. H., Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase III clinical trial. *J. Clin. Oncol.*, **16**, 2445-2451 (1998).
- Northfelt, D. W., Martin, F. J., Working, P., Volberding, P. A., Russell, J., Newman, M., Amantea, M. A. e Kaplan, L. D., Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Pharmacol.*, **36**, 55-63 (1996).
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S. e Caron, M. G., Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.*, **274**, 32248-32257 (1999).
- Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J. e Papahadjopoulos, D., Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **557**, 9-23 (1979).
- Oussoren, C. e Storm, G., Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection: III. Influence of surface modification with poly(ethyleneglycol). *Pharm. Res.*, **14**, 1479-1484 (1997).
- Oussoren, C., Velinova, M., Scherphof, G., van der Want, J. J., van Rooijen, N. e Storm, G., Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. IV. Fate of liposomes in regional lymph nodes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1370**, 259-272 (1998).
- Pagnan, G., Montaldo, P. G., Pastorino, F., Raffaghello, L., Kirchmeier, M., Allen, T. M. e Ponzoni, M., GD2-mediated melanoma cell targeting and cytotoxicity of liposome-entrapped fenretinide. *Int. J. Cancer*, **81**, 268-274 (1999).
- Pagnan, G., Stuart, D. D., Pastorino, F., Raffaghello, L., Montaldo, P. G., Allen, T. M., Calabretta, B. e Ponzoni, M., Delivery of c-myc antisense oligodeoxynucleotides to human neuroblastoma cells via disialoganglioside GD(2)-targeted immunoliposomes: antitumor effects. *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**, 253-261 (2000).

- Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthey, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D., Redemann, C. e Martin, F. J., Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11460-11464 (1991).
- Park, J. W., Hong, K., Carter, P., Asgari, H., Guo, L. Y., Keller, G. A., Wirth, C., Shalaby, R., Kotts, C., Wood, W. I., Papahadjopoulos, D. e Benz, C. C., Development of anti-p185^{HER2} immunoliposomes for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1327-1331 (1995).
- Park, J. W., Hong, K., Kirpotin, D. B., Papahadjopoulos, D. e Benz, C. C., Immunoliposomes for cancer treatment. *Adv. Pharmacol.*, **40**, 399-435 (1997).
- Park, J. W., Kirpotin, D. B., Hong, K., Shalaby, R., Shao, Y., Nielsen, U. B., Marks, J. D., Papahadjopoulos, D. e Benz, C. C., Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *J. Control. Release*, **74**, 95-113 (2001).
- Parr, M. J., Ansell, S. M., Choi, L. S. e Cullis, P. R., Factors influencing the retention and chemical stability of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1195**, 21-30 (1994).
- Patel, H. M., Tuzel, N. S. e Ryman, B. E., Inhibitory effect of cholesterol on the uptake of liposomes by liver and spleen. *Biochim. Biophys. Acta*, **761**, 142-151 (1983).
- Pfeiffer, R., Kirsch, J. e Fahrenholz, F., Agonist and antagonist-dependent internalization of the human vasopressin V2 receptor. *Exp. Cell Res.*, **244**, 327-339 (1998).
- Proffitt, R. T., Williams, L. E., Presant, C. A., Tin, G. W., Uliana, J. A., Gamble, R. C. e Baldeschwieler, J. D., Liposomal blockade of the reticuloendothelial system: improved tumor imaging with small unilamellar vesicles. *Science*, **220**, 502-505 (1983).
- Puisieux, F. e Roblot-Treupel, L., Vectorization et vecteurs de médicaments. *S.T.P. PHARMA*, **5**, 107-113 (1989).
- Radulovic, S., Miller, G. e Schally, A. V., Inhibition of growth of HT-29 human colon

- cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin releasing peptide antagonist (RC-3095). *Cancer Res.*, **51**, 6006-6009 (1991).
- Ranson, M. R., Carmichael, J., O'Byrne, K., Stewart, S., Smith, D. e Howell, A., Treatment of advanced breast cancer with sterically stabilized liposomal doxorubicin: results of a multicenter phase II trial. *J. Clin. Oncol.*, **15**, 3185-3191 (1997).
- Reeve, J. G. e Bleehen, N. M., [D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹] substance P induces apoptosis in lung cancer cell lines in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 1313-1319 (1994).
- Regev, R. e Eytan, G. D., Flip-flop of doxorubicin across erythrocyte and lipid membranes. *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 1151-1158 (1997).
- Ríhová, B., Receptor-mediated targeted drug or toxin delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **29**, 273-289 (1998).
- Roblot-Treupel, L. e Puisieux, F., Les nouvelles formes d'administration des médicaments. *L' Mondiale Paris*, **94**, 11-18 (1986).
- Roerdink, F., Regts, J., Van Leeuwen, B. e Scherphof, G., Intrahepatic uptake and processing of intravenously injected small unilamellar phospholipid vesicles in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **770**, 195-202 (1984).
- Romero, E. L., Morilla, M. J., Regts, J., Koning, G. A. e Scherphof, G. L., On the mechanism of hepatic transendothelial passage of large liposomes. *FEBS Lett.*, **448**, 193-196 (1999).
- Russo, R., Nigro, L. C., Minniti, S., Montineri, A., Gradoni, L., Caldeira, L. e Davidson, R. N., Visceral leishmaniasis in HIV infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome). *J. Infect.*, **32**, 133-137 (1996).
- Rygaard, K., Vindeløv, L. L. e Spang-Thomsen, M., Expression of myc family oncoproteins in small-cell lung-cancer cell lines and xenografts. *Int. J. Cancer*, **54**, 144-152 (1993).
- Sapra, P. e Allen, T. M., Targeting of immunoliposomal vincristine to hematological

- malignancies, *Proc. 28th Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, pp. #5219, San Diego, USA (2001).
- Sarti, P., Ginobbi, P., D'Agostino, I., Arancia, G., Lendaro, E., Molinari, A., Ippoliti, R. e Citro, G., Liposomal targeting of leukaemia HL60 cells induced by transferrin-receptor endocytosis. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **24**, 269-276 (1996).
- Scherphof, G. L., Velinova, M., Kamps, J., Donga, J., van der Want, H., Kuipers, F., Havekes, L. e Daemen, T., Modulation of pharmacokinetic behaviour of liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **24**, 179-191 (1997).
- Seckl, M. J., Newman, R. H., Freemont, P. S. e Rozengurt, E., Substance P-related antagonists inhibit vasopressin and bombesin but not 5'-3-O-(thio)triphosphate-stimulated inositol phosphate production in Swiss 3T3 cells. *J. Cell. Physiol.*, **163**, 87-95 (1995).
- Sekido, Y., Fong, K. M. e Minna, J. D., Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1378**, F21-F59 (1998).
- Semple, S. C., Chonn, A. e Cullis, P. R., Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**, 3-17 (1998).
- Senior, J., Delgado, C., Fisher, D., Tilcock, C. e Gregoriadis, G., Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 77-82 (1991).
- Sethi, T., Langdon, S., Smyth, J. e Rozengurt, E., Growth of small cell lung cancer cells: stimulation by multiple neuropeptides and inhibition by broad spectrum antagonists in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, **52s**, 2737s-2742s (1992).
- Shi, N. e Pardridge, W. M., Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7567-7572 (2000).
- Shi, N., Zhang, Y., Zhu, C., Boado, R. J. e Pardridge, W. M., Brain-specific expression

- of an exogenous gene after i.v. administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12754-12759 (2001).
- Silerud, L. O., Prestegard, J. H., Yu, R. K., Schafer, D. E. e Konigsberg, W. H., Assignment of the ^{13}C nuclear magnetic resonance spectrum of aqueous ganglioside GM₁ micelles. *Biochemistry*, **17**, 2619-2628 (1978).
- Simões, S., O uso de lipossomas fusogénicos em terapia génica. Tese de Doutoramento. *Faculdade de Farmácia*, pp. 317, Coimbra, Universidade de Coimbra (1998).
- Simões, S., Pires, P., Düzgünes, N. e Pedroso de Lima, M. C., Cationic liposomes as gene transfer vectors: barriers to successful application in gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **1**, 147-157 (1999).
- Simões, S., Slepushkin, V., Düzgünes, N. e Pedroso de Lima, M. C., On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1515**, 23-37 (2001).
- Slepushkin, V. A., Simões, S., Dazin, P., Newman, M. S., Guo, L. S., Pedroso de Lima, M. C. e Düzgünes, N., Sterically stabilized pH-sensitive liposomes. Intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2382-2388 (1997).
- Sommerman, E. F., Pritchard, P. H. e Cullis, P. R., ^{125}I labelled inulin: a convenient marker for deposition of liposomal contents in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 319-324 (1984).
- Sorenson, G. D., Pettengill, O. S., Brinck-Johnsen, T., Cate, C. C. e Maurer, L. H., Hormone production by cultures of small-cell carcinoma of the lung. *Cancer*, **47**, 1289-1296 (1981).
- Sotto-Mayor, R. e Queiroga, H., Cancro do pulmão. In: Sociedade Portuguesa Pneumologia (ed.), *Curso Interactivo de Pneumologia*, pp. 1-54, Permaneyer Portugal, Lisboa, Portugal (1997).
- Souhami, R. L., Patel, H. M. e Ryman, B. E., The effect of reticuloendothelial blockade on the blood clearance and tissue distribution of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*,

674, 354-371 (1981).

Spragg, D. D., Alford, D. R., Greferath, R., Larsen, C. E., Lee, K. D., Gurtner, G. C., Cybulsky, M. I., Tosi, P. F., Nicolau, C. e Gimbrone, M. A., Jr., Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: a strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8795-8800 (1997).

Storm, G. e Woodle, M. C., Long circulating liposome therapeutics: from concept to clinical reality. In: M. C. Woodle, G. Storm (eds.), *Long Circulating Liposomes. Old Drugs, New Therapeutics*, pp. 3-16, Springer-Verlag, Berlin (1998).

Sugano, M., Egilmez, N. K., Yokota, S. J., Chen, F. A., Harding, J., Huang, S. K. e Bankert, R. B., Antibody targeting of doxorubicin-loaded liposomes suppresses the growth and metastatic spread of established human lung tumor xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.*, **60**, 6942-6949 (2000).

Takikawa, M., Kikkawa, H., Asai, T., Yamaguchi, N., Ishikawa, D., Tanaka, M., Ogino, K., Taki, T. e Oku, N., Suppression of GD1 α ganglioside-mediated tumor metastasis by liposomalized WHW-peptide. *Febs Lett.*, **466**, 381-384 (2000).

Talsma, H., Preparation, characterization and stabilization of liposomes. Ph. D. Thesis. *Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy*, pp. 121, University of Utrecht, Utrecht (1991).

Tirosh, O., Barenholz, Y., Katzhendler, J. e Priev, A., Hydration of polyethylene glycol-grafted liposomes. *Biophys. J.*, **74**, 1371-1379 (1998).

Tomayko, M. M. e Reynolds, C. P., Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **24**, 148-154 (1989).

Torchilin, V. P., Omelyanenko, V. G., Papisov, M. I., Bogdanov, A. A., Jr., Trubetsky, V. S., Herron, J. N. e Gentry, C. A., Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1195**, 11-20 (1994).

Tseng, Y. L., Hong, R. L., Tao, M. H. e Chang, F. H., Sterically stabilized anti-idiotypic

- immunoliposomes improve the therapeutic efficacy of doxorubicin in a murine B-cell lymphoma model. *Int. J. Cancer*, **80**, 723-730 (1999).
- Uster, P. S., Allen, T. M., Daniel, B. E., Mendez, C. J., Newman, M. S. e Zhu, G. Z., Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. *FEBS Lett.*, **386**, 243-246 (1996).
- van Etten, E. W., van den Heuvel-de Groot, C. e Bakker-Woudenberg, I. A., Efficacies of amphotericin B-desoxycholate (Fungizone), liposomal amphotericin B (AmBisome) and fluconazole in the treatment of systemic candidosis in immunocompetent and leucopenic mice. *J. Antimicrob. Chemoth.*, **32**, 723-739 (1993).
- Vigevani, A. e Williamson, M. J., Doxorubicin. In: K. Florey (ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances, Analytical Profiles of Drug Substances*. Vol. 9, pp. 245-274, Academic Press, Inc., Orlando (1980).
- Vingerhoeds, M. H., Steerenberg, P. A., Hendriks, J. J., Dekker, L. C., Van Hoesel, Q. G., Crommelin, D. J. e Storm, G., Immunoliposome-mediated targeting of doxorubicin to human ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer*, **74**, 1023-1029 (1996).
- Wallis, C., Molecular revolution, *Time*. Vol. 151, pp. 22-24 (1998).
- Webb, M. S., Logan, P., Kanter, P. M., St-Onge, G., Gelmon, K., Harasym, T., Mayer, L. D. e Bally, M. B., Preclinical pharmacology, toxicology and efficacy of sphingomyelin/cholesterol liposomal vincristine for therapeutic treatment of cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **42**, 461-470 (1998).
- Weinstein, J. N., Ralston, E., Leserman, L., Klausner, R. D., Dragsten, P., Henkart, P. e Blumenthal, R., Self-quenching of carboxyfluoresceine fluorescence: uses in studying liposome stability and liposome cell-interaction. In: G. Gregoriadis (ed.), *Liposome Technology*. Vol. III, pp. 183-204, CRC Press, Inc., Boca Raton (1984).
- Weinstein, J. N., Yoshikami, S., Henkart, P., Blumenthal, R. e Hagins, W. A., Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science*, **195**, 489-492 (1977).

- Wilson, A. P., Cytotoxicity and viability assays. In: R. I. Freshney (ed.), *Animal Cell Culture: a Practical Approach, Practical Approach Series*, pp. 263-303, Oxford University Press, Oxford (1992).
- Woll, P. J. e Rozengurt, E., [D-Arg¹,D-Phe⁵,D-Trp^{7,9},Leu¹¹]substance P, a potent bombesin antagonist in murine Swiss 3T3 cells, inhibits the growth of human small cell lung cancer cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1859-1863 (1988).
- Woll, P. J. e Rozengurt, E., A neuropeptide antagonist that inhibits the growth of small cell lung cancer in vitro. *Cancer Res.*, **50**, 3968-3973 (1990).
- Woodle, M. C., Collins, L. R., Sponsler, E., Kossovsky, N., Papahadjopoulos, D. e Martin, F. J., Sterically stabilized liposomes. Reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. *Biophys. J.*, **61**, 902-910 (1992a).
- Woodle, M. C., Matthey, K. K., Newman, M. S., Hidayat, J. E., Collins, L. R., Redemann, C., Martin, F. J. e Papahadjopoulos, D., Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1105**, 193-200 (1992b).
- Wu, N. Z., Da, D., Rudoll, T. L., Needham, D., Whorton, A. R. e Dewhirst, M. W., Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of stealth liposomes in tumor tissue. *Cancer Res.*, **53**, 3765-3770 (1993).
- Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M. e Schlom, J., Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.*, **52**, 3402-3408 (1992).
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D. A., Torchilin, V. P. e Jain, R. K., Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.*, **55**, 3752-3756 (1995).
- Zalipsky, S., Hansen, C. B., Lopes de Menezes, D. E. e Allen, T. M., Long-circulating, polyethylene glycol-grafted immunoliposomes. *J. Control. Release*, **39**, 153-161 (1996a).

- Zalipsky, S., Hansen, C. B., Oaks, J. M. e Allen, T. M., Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of poly(2-oxazoline)-grafted liposomes. *J. Pharm. Sci.*, **85**, 133-137 (1996b).
- Zalipsky, S., Mullah, N., Harding, J. A., Gittelman, J., Guo, L. e DeFrees, S. A., Poly(ethylene glycol)-grafted liposomes with oligopeptide or oligosaccharide ligands appended to the termini of the polymer chains. *Bioconjugate Chem.*, **8**, 111-118 (1997).
- Zalipsky, S., Puntambekar, B., Boulikas, P., Engbers, C. M. e Woodle, M. C., Peptide attachment to extremities of liposomal surface grafted PEG chains: preparation of the long-circulating form of laminin pentapeptide, YIGSR. *Bioconjugate Chem.*, **6**, 705-708 (1995).
- Zelphati, O. e Szoka, F. C., Jr., Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm. Res.*, **13**, 1367-1372 (1996).
- Zignani, M., Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K. e Leroux, J., In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1463**, 383-394 (2000).