



Análisis comparativo de diferentes formulaciones de Anfotericina B y su incidencia sobre la seguridad del paciente

Comparative analysis of different formulations of Amphotericin B and their impact on patient safety

GABRIEL E. HERNÁNDEZ ZAMBRANO¹, ANA P. PEREIRA CORREIA², DANIEL A. PIRE ÁLVAREZ³, ESTHEFANY R. REQUEZ CABRERA⁴, GABRIELA A. SIMOZA LÓPEZ^{5,*}

Resumen

La Anfotericina B desoxicolato es un agente antifúngico de amplio espectro, activo contra la mayoría de las especies de hongos clínicamente relevantes. Su mecanismo principal consiste en formar complejos con el ergosterol en las membranas celulares de los hongos. Este fármaco está vinculado con fuertes efectos adversos relacionados a la infusión e importante nefrotoxicidad, por lo que se desarrollaron diferentes formulaciones solubles en lípidos que han mejorado su perfil de seguridad, generando mayor confianza y adherencia a esta terapia; sin embargo, existen diferencias significativas dentro de las diferentes formulaciones solubles en lípidos. Tras varios estudios comparativos realizados entre las diferentes formas de Anfotericina B, se ha determinado que las nuevas tecnologías que permiten encapsulación del principio activo a través de liposomas benefician al paciente en la seguridad y efectividad; mejora su absorción, penetración y difusión, al mismo tiempo que estabiliza el principio activo y ofrece una mayor protección contra la oxidación. Además, la presencia de lípidos le confieren mayor afinidad y especificidad en el organismo. Sin embargo, el simple hecho de desarrollar un liposoma no asegura que el mismo posea características ideales, por lo que es de gran importancia identificar y controlar los parámetros críticos del proceso de manufactura que permitan asegurar la reproducibilidad lote a lote y la obtención de un producto de calidad que brinde seguridad y eficacia desde el momento de su desarrollo hasta el instante de la administración directa al paciente.

Palabras clave: Anfotericina B, antifúngico, efectos adversos, nefrotoxicidad, lípidos, liposomas, perfil de seguridad, especificidad, parámetros críticos

Abstract

Amphotericin B deoxycholate is a broad-spectrum antifungal agent, active against most clinically relevant fungal species. Its main mechanism consists of forming complexes with ergosterol in the cell membranes of fungi. This drug is associated with strong side effects related to the infusion and significant nephrotoxicity, which is why different lipid-soluble formulations have been developed to improve its safety profile, increasing confidence and adherence to this therapy; however, there are significant differences within the different lipid soluble formulations. After several comparative studies carried out between the different forms of Amphotericin B, it has been determined that new technologies allowing the encapsulation of the active drug through liposomes bring great benefits to the patient regarding safety and efficacy; improve its absorption, penetration, and diffusion, while stabilizing the active principle and offering greater protection against oxidation. In addition, presenting lipids increases affinity and specificity within the body. However, simply creating a liposome does not ensure that it has ideal characteristics, so it is of great importance to be able to identify and control the critical parameters of the manufacturing process that ensure batch-to-batch reproducibility and obtaining a quality product that provides safety and efficacy from the moment of its development until direct administration to the patient.

Keywords: Amphotericin B, antifungal, adverse effects, nephrotoxicity, lipids, liposomes, safety profile, specificity, critical parameters

Facultad de Farmacia, UCV, *Correspondencia: gabi.simoza@gmail.com

Orcid: ¹ [0000-0002-6625-6848](https://orcid.org/0000-0002-6625-6848)

² [0000-0003-1183-3297](https://orcid.org/0000-0003-1183-3297)

³ [0000-0003-3865-4360](https://orcid.org/0000-0003-3865-4360)

⁴ [0000-0001-8234-8032](https://orcid.org/0000-0001-8234-8032)

⁵ [0000-0003-0819-2863](https://orcid.org/0000-0003-0819-2863)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.7](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2023.86.1-2.7)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 27/02/2023

Aprobación: 02/05/2023

Rev. Fac. Farmacia 86(1y2): 56-69. 2023

Introducción

Actualmente, se reconoce que los hongos tienen un papel importante en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas y su desaparición podría afectar directamente la subsistencia de otras especies. Sin embargo, Alcántara (2010) establece que, aún existe resistencia para reconocer su impacto global en la salud humana, posiblemente porque muchas de las infecciones fúngicas cursan de manera asintomática o con manifestaciones intermedias. De esta manera, la vigilancia epidemiológica se enfoca principalmente en los casos severos.

La Fundación de Acción Global para las Infecciones Fúngicas (*GAFFI*) ha estimado de manera reciente que más de 300 millones de personas en el mundo padecen enfermedades severas de etiología fúngica, y se calcula que cada año ocurren 1.6 millones de muertes, lo que es superior al número de defunciones por malaria y tuberculosis (Rivera, 2020).

Durante las últimas décadas, la incidencia de infecciones fúngicas ha aumentado, principalmente en pacientes con algún grado de inmunosupresión, receptores de trasplantes de órganos, enfermedades autoinmunes y usuarios de la unidad de cuidado intensivo; esto a causa del progreso de la medicina con quimioterapias más agresivas, el uso de corticosteroides y uso de forma indiscriminada de antimicrobianos de amplio espectro, generando variantes más virulentas resistentes a antimicóticos (Pemán y Salavert, 2012).

Rivera (2020) establece que las 300 especies de hongos reconocidas como patógenas para los humanos, incluidas en los géneros *Candida*, *Aspergillus*,

Histoplasma, *Pneumocystis* y *Cryptococcus* son las principales causales de enfermedad severa.

Actualmente, existen cinco grupos de fármacos antifúngicos que se utilizan en la clínica, clasificados con base en su estructura química: Azoles, alilaminas, lipopéptidos, pirimidinas y polienos, dentro de los cuales se encuentra la Anfotericina B (Gregorí, 2005).

En 1959 fue aprobada por la *Food and Drugs Administration* (FDA), por primera vez, la Anfotericina B bajo la forma soluble de desoxicolato de sodio, sin embargo, al evaluar las reacciones que presentaban los pacientes bajo dicho tratamiento, se observó un elevado porcentaje de efectos adversos que supera sus beneficios (Suberviola, 2022).

La formulación de anfotericina B desoxicolato ha sido ampliamente estudiada con el fin de crear una que sea segura para los pacientes, sin afectar su efectividad terapéutica, con lo que actualmente ha sido reemplazada por formulaciones asociadas a lípidos que han intentado mejorar la solubilidad de las moléculas apolares de anfotericina B convencional. Tres productos a base de lípidos están disponibles actualmente: La anfotericina B dispersión coloidal, anfotericina B liposomal y anfotericina B complejo lipídico.

El presente estudio tuvo como objetivo analizar, de forma comparativa, la incidencia de diferentes formulaciones de Anfotericina B sobre la seguridad del paciente. Para ello, se procedió a: 1. Describir diferencias entre los parámetros farmacocinéticos de la Anfotericina B desoxicolato y anfotericina B en sus formas lipídicas; 2. Comparar las reacciones adversas de anfotericina

B desoxicolato, anfotericina B lipídica y anfotericina B liposomal a nivel renal, hematológico y las dependientes de la infusión durante el tratamiento; 3. Comparar las formulaciones de anfotericina B desoxicolato, anfotericina B lipídica y anfotericina B liposomal; 4. Evaluar los parámetros críticos en el proceso de manufactura de Anfotericina B liposomal que garanticen la reproducibilidad y seguridad de la misma.

Materiales y métodos

Métodos

La investigación es tipo descriptiva debido a que busca detallar las características de las formulaciones de Anfotericina B convencional y Anfotericina B en sus formas lipídicas para establecer comparaciones y definir cuál es la más segura y eficaz. El diseño de investigación utilizado es de tipo documental, ya que se fundamenta en seleccionar diversas fuentes primarias con referencia a las formulaciones de distintos tipos de Anfotericina B, destacando sus diferencias estructurales, tecnológicas, reacciones adversas, propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas para de esta manera poder establecer conclusiones acerca de la seguridad y eficacia en cada caso.

Se seleccionaron ocho trabajos experimentales para realizar el análisis comparativo de la incidencia sobre la seguridad del paciente con las diferentes formulaciones de Anfotericina B, los cuales se indican a continuación.

1. Anfotericina B desoxicolato versus anfotericina B liposomal: efectos sobre la función renal (Botero y Restrepo, 2015).

2. Distribución tisular de anfotericina B en material de autopsia después del tratamiento con anfotericina B liposomal y dispersión coloidal de anfotericina B. Vogelsinger y col., 2006).
3. Análisis comparativo de seguridad entre anfotericina B convencional y anfotericina B complejo lipídico en pacientes del hospital nacional Edgardo Rebagliati Martins en el período 2011-2012 (Espinoza, 2014).
4. Formulaciones liposolubles de anfotericina B versus anfotericina B en pacientes oncológicos con neutropenia (Johansen y Gøtzsche, 2017).
5. Toxicidades hematológicas asociadas con las formulaciones de Anfotericina (Falci y col., 2015).
6. Comparación entre formulaciones liposomales de anfotericina B (Adrel-Moore y col., 2016).
7. Optimización del proceso de manufactura de complejos liposomales de anfotericina B usando el enfoque de calidad por diseño (Liu y col., 2020).
8. Parámetros críticos en el proceso de manufactura de formulaciones liposomales de anfotericina B (Rivnay y col., 2019).

Resultados

La anfotericina B convencional se ha utilizado como tratamiento estándar para infecciones fúngicas invasivas, sin embargo, presenta diversas reacciones adversas,

entre ellas, lesión renal. Se han desarrollado nuevas formulaciones de anfotericina B asociadas a lípidos, que presentan un mejor perfil de seguridad. Botero y Restrepo, 2015, evaluaron los efectos de la anfotericina B convencional y anfotericina B liposomal en la función renal.

Los hallazgos indican que la anfotericina liposomal B fue significativamente más segura que la anfotericina B convencional en términos de aumento de creatinina sérica. Además, hubo una disminución significativa en todas las reacciones relacionadas con la infusión en el grupo liposomal en comparación con el grupo convencional: fiebre 32%; escalofríos 75%; fiebre y/o rigores 58%; náuseas 0 % y vómitos 61 % (Botero y Restrepo, 2015).

Las formulaciones lipídicas de la anfotericina B muestran diferencias notables en su farmacocinética plasmática, las cuales pueden atribuirse a la diversidad fisicoquímica de las fracciones lipídicas.

Vogelsinger y col., 2006 determinaron concentraciones tisulares de anfotericina B en material de autopsia de pacientes con una infección fúngica invasiva sospechosa o comprobada, tratados con anfotericina B liposomal o anfotericina B en dispersión coloidal. Encontraron que, las concentraciones más altas de anfotericina B se estaban presentes en el hígado y el bazo y en menor proporción en riñón, pulmón, miocardio y tejido cerebral. Los resultados obtenidos en el tejido hepático fueron $102,81 \pm 68,72 \mu\text{g/g}$, en el grupo de pacientes evaluados con anfotericina B liposomal y $94,42 \pm 60,17 \mu\text{g/g}$ en el grupo de anfotericina B dispersión coloidal. Con respecto a las concentraciones reportadas en el bazo son $60,32 \pm 29,75 \mu\text{g/g}$ y $81,34 \pm 57,97 \mu\text{g/g}$, respectivamente (Vogelsinger y col., 2006).

La anfotericina B (AnB) liposomal tiene un perfil farmacocinético significativamente diferente al de las presentaciones convencionales. En la Tabla I se ilustran los parámetros farmacocinéticos más significativos de las diferentes formulaciones de la AnB a las dosis de administración más frecuentes. Estos valores están basados en las determinaciones de las concentraciones plasmáticas de AnB total en humanos tras la administración de dosis múltiples por vía endovenosa (Espinoza, 2014).

Como se puede apreciar en la Figura 1, no se encontraron diferencias significativas en la presencia de reacciones adversas a nivel de perfil hematológico y hepático entre los pacientes que utilizaron AmB y ABCL.

Por el contrario, se encontraron diferencias estadísticas significativas a favor de ABCL en el incremento de creatinina sérica (valor-p = 0,009) y en la probabilidad de incremento de esta al 20% a las dos semanas de tratamiento.

Al comparar la AmBisome vs. Anfotericina B convencional, la forma liposomal resultó en una disminución de la incidencia de nefrotoxicidad definida como un aumento del 100% en creatinina sérica, comparada con la anfotericina B convencional, además, reportó menos reacciones adversas relacionadas con la infusión.

Por otro lado, los pacientes tratados con dispersión coloidal de anfotericina B (ABCD) experimentaron significativamente menos nefrotoxicidad que aquellos a los que se administró anfotericina B convencional. Hubo más reacciones relacionadas con la infusión y más casos de eventos hipóxicos con ABCD.

Tabla I.

Parámetros farmacocinéticos de las diferentes formas farmacéuticas de Anfotericina B vía administración endovenosa

Parámetros farmacocinéticos de las diferentes formas farmacéuticas de Anfotericina B vía administración endovenosa.						
Forma farmacéutica	Dosis	Parámetros				
	mg/kg/día	Cmax (µg/mL)	ABC (µg*h/mL)	Vd (L/kg)	t 1/2 (h)	Cl (mL/h/kg)
Anfotericina B desoxicolato	0.6 - 1	1.1 - 1.8 ± 0.2	17.1 - 18.6 ± 5	2.7 - 5 ± 2.8	24 - 27 ± 10	38 - 39.9 ± 15
Anfotericina B complejo lipídico	5	1.7 ± 0.8	14 ± 7	131 ± 7.7	380 ± 486	436 ± 188.5
Anfotericina B dispersión coloidal	4 - 5	2.9 - 3.1	36 - 43	4.1 - 4.3	27 - 28.2	117 - 125
Anfotericina B liposomal	2.8 - 5	48 - 83 ± 35.2	466 - 555 ± 171	0.09 - 0.11 ± 0.06	8.6 - 8.7 ± 3.1	6.7 - 11 ± 4

Cmax: Concentración máxima; ABC: Área bajo la curva; Vd: Volumen de distribución; t 1/2: tiempo de vida media; Cl: Aclaramiento total de creatinina . (Espinoza, 2014).

En cuanto a los pacientes tratados con complejo lipídico de anfotericina B (ABLC) experimentaron significativamente menos nefrotoxicidad y menos abandonos a la terapia que aquellos a los que se le administró la forma convencional de anfotericina B, así como una menor expresión de efectos adversos por infusión (Johansen y Gøtzsche, 2017).

La anemia es un evento adverso bien descrito relacionado con el uso de anfotericina B (AmB). Hasta una cuarta parte de los pacientes que reciben este medicamento desarrollan anemia, y la frecuencia de esta complicación puede llegar al 95% si se usa AmB por más de 30 días. Además de anemia, también se han descrito la leucopenia y trombocitopenia en pacientes que reciben AmB. Sin embargo, estos efectos parecen ser menos frecuentes en comparación a la anemia. Al respecto, Falci y col. (2015), en un estudio de cohorte retrospectiva, evaluaron la incidencia y predictores de toxicidad hematológica en pacientes tratados con diferentes formulaciones de anfotericina B: anfotericina B desoxicolato (d-AmB), anfotericina B liposomal (L-AmB) y complejo lipídico de anfotericina B (ABLC).

Los hallazgos demostraron que se produjo anemia grave en casi una cuarta parte de los pacientes tratados con L-AmB (16,8%), en comparación con los pacientes tratados con d-AmB (25,4%) y ABLC (30,2%). Además, la terapia con L-AmB resultó en una menor reducción en los niveles de hemoglobina (13,3%), en comparación con el tratamiento de d-AmB (29,6%) y ABLC (23,8%). De esta manera, se puede afirmar que la formulación de L-AmB

Reacción Adversa al Medicamento	Medicamento		Significancia	
	AmB (% de RAMs)	ABCL (% de RAMs)		
Perfil Sanguíneo	Disminución de Hemoglobina	5/35 (14.3%)	1/9 (11.1%)	1.0*
	Disminución de Neutrófilos	1/35 (2.9%)	0/9 (0.0%)	1.0*
	Disminución de Linfocitos	6/35 (17.2%)	0/9 (0.0%)	0.428*
	Disminución de Plaquetas	2/35 (5.8%)	0/9 (0.0%)	1.0*
	Total [†]	12/35 (34.3%)	1/9 (11.1%)	0.342*
Perfil Renal	Aumento de Creatinina	6/64 (9.4%)	0/20 (0%)	0.356*
	Disminución de Potasio	39/63 (61.9%)	10/21 (47.6%)	0.371*
	Disminución de Magnesio	0/60 (0.0%)	1/12 (8.3%)	0.368*
	Disminución de Calcio	9/59 (15.3%)	2/13 (15.4%)	1.0*
	Disminución de Fósforo	10/51 (19.6%)	2/11 (18.2%)	1.0*
	Total [†]	34/48 (70.8%)	8/11 (72.7%)	1.0*
Perfil Hepático	Aumento de Bilirrubina Total	6/52 (11.5%)	1/11 (9.1%)	1.0*
	Aumento de ALT	2/53 (3.8%)	1/9 (11.1%)	0.914*
	Aumento de AST	1/53 (1.9%)	0/9 (0.0%)	1.0*
	Aumento de Fosfatasa Alcalina	1/49 (2.0%)	0/9 (0.0%)	1.0*
	Total [†]	7/46 (15.2%)	2/8 (25.0%)	0.864*

Figura 1. Reacciones adversas durante el tratamiento con Anfotericina B desoxicolato (AmB) y Anfotericina B Complejo Lipídico (ABCL)

tiene menor incidencia en efectos adversos relacionados con anemia con respecto a las otras formulaciones evaluadas.

En relación con la Leucopenia, los pacientes en el grupo ABLC experimentaron una tendencia hacia una mayor frecuencia de leucopenia severa (13,8%) que los pacientes con tratamiento de L-AmB (5,6%), d-AmB (6,0%). Por consiguiente, se puede decir que, aunque la forma liposomal no es la de elección en caso de riesgos de leucopenia, si lo es la forma del complejo lipídico con respecto a la convencional. Finalmente, en el caso de trombocitopenia se observaron diferencias considerables de trombocitopenia grave entre los grupos con tratamiento de ABLC (21,8%), L-AmB (13,6%), d-AmB (15,9%). Siendo así, el de elección el complejo lipídico en comparación con las otras formulaciones (Falci y col., 2015).

Debido al éxito comercial y la eficacia clínica de los productos lipídicos de anfotericina B, se comenzó a elaborar formulaciones genéricas de anfotericina B liposomal. Sin embargo, existe la preocupación de que los productos genéricos pueden no ser bioequivalentes al producto original, lo que da como resultado diferentes niveles de eficacia y tolerabilidad. Esto tiene una relevancia clínica particular para los productos de anfotericina B liposomal dada la toxicidad del agente activo. En ese sentido, Adler-Moore y col., 2016 realizaron una comparación de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las diversas formulaciones liposomales de anfotericina B.

Se evaluaron diferentes formulaciones a saber: AmBisome (*Australian Government Department of Health, Therapeutic Goods Administration*), Lambin (Olson et al., Med

Mycol 2015), Lipholyn (Product inserts for Ambihope (Abbott India Ltd., 2013) and Lipholyn (Lyka Labs, 2013), Ampholip (Pharmaris,; <http://pharmarisperu.com/en-linea-bharat-serums-and-vaccines.php>) y Fungisome (Romero y Morilla, Expert Opin Drug Deliv 2008).

Se sabe que la eficacia y seguridad de cualquier producto de AmB liposomal se determina principalmente por la velocidad y el grado de liberación de AmB de los liposomas después de su administración. Para AmBisome existen varios atributos fisicoquímicos que han contribuido a su índice terapéutico favorable. Primero, el tamaño pequeño de estos liposomas (< 100 nm) que da como resultado una circulación prolongada que permite la distribución en muchos órganos diferentes. En segundo lugar, su composición asegura que la AmB permanezca asociada con la bicapa de los liposomas hasta su contacto con el hongo, minimizando los efectos adversos de la AmB en los tejidos del huésped. Para ello, estos liposomas están compuestos por colesterol que se une a la AmB, así como fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) y diestearoil fosfatidilglicerol (DSPG) que son estables en el organismo a 37°C.

Efectivamente, los hallazgos mostraron que la forma de AmBisome contribuye a menores efectos con respecto a las otras formas comerciales debido a un menor tamaño de partícula. En la Figura 2, se puede apreciar mediante estudios preclínicos AmBisome con otros dos productos AmB liposomales, Anfogen® (Genpharma, S.A., Argentina) y Lambin® (Sun Pharmaceutical Industries Ltd.) que tienen la misma composición química que AmBisome. AmBisome era notablemente menor (30– 36%) que los otros dos agentes.

	AmBisome vs Anfogen [1]		AmBisome vs Lambin [2]	
	AmBisome	Anfogen	AmBisome	Lambin
Median diameter of liposomes (nm)	77.8	111.5	77.8	122.2
RBC toxicity (K ₅₀ µg/ml)	20	0.9	7.4	1.4
Maximum tolerated single iv dose (mg/kg)	>100	10	>50	20
BUN at 7.5 mg/kg	12 (normal)	78	NL	NL
Renal tubular necrosis with daily 5 mg/kg dosing in uninfected mice	Normal renal tubules	Renal tubular dilation	Normal renal tubules	Renal tubular dilation
Survival following <i>A. fumigatus</i> challenge and drug treatment	7.5 mg/kg, 4X: 100%	7.5 mg/kg, 4X: 70%	10 mg/kg, 6X: 60%	10 mg/kg, 6X: 30%

Abbreviations: RBC: red blood cell, iv: intravenous, BUN: blood urea nitrogen, NL: within normal limits.

Figura 2. Resultados de estudios preclínicos que comparan AmBisome con Anfogen o Lambin

Con las pruebas *in vivo*, AmBisome también fue significativamente menos tóxico en base a la dosificación intravenosa única de DL₅₀ y con la dosificación diaria, hubo significativamente menos necrosis tubular renal. Los resultados muestran que las diferencias en las condiciones de procesamiento con productos que tienen la misma composición química pueden tener un efecto importante en las características funcionales del principio activo.

Para concluir, este estudio ha demostrado que la comparación de productos de anfotericina B liposomal con composiciones químicas diferentes o iguales, usando diferentes métodos de producción, variará en tamaño y tendrá toxicidades significativamente diferentes *in vitro* e *in vivo* junto con una eficacia reducida. Estos resultados subrayan la importancia de establecer pruebas de bioequivalencia adecuadas para los productos de liposomas para garantizar la uniformidad de su índice terapéutico (Adler-Moore y col., 2016).

Diferentes estudios demuestran que la eficacia del producto y sus propiedades son afectadas significativamente por los ingredientes en la fórmula, así como la técnica de manufactura, por lo que se hace énfasis en evaluar los procesos que se llevan

a cabo en la elaboración de liposomas de anfotericina B. Liu y col. (2020) optimizaron el proceso de fabricación de un producto complejo de anfotericina B liposomal (AmB) mediante el enfoque de calidad por diseño (QbD), dividiéndolos en 4 etapas: mezcla orgánica, secado, hidratación y formación de liposomas, finalmente liofilización. El proceso se basó en la formación asistida por ácido de complejos fármaco-lípidos en una mezcla de metanol-cloroformo (paso I), seguido de secado por aspersion (paso II), hidratación y formación de liposomas por microfluidización (paso III) y liofilización (paso IV).

Los estudios de Liu y col., 2020 demostraron que la eficacia y las propiedades del fármaco eran significativas, y que se afectan significativamente por los ingredientes de la formulación y el proceso fabricación. Al evaluar la influencia de parámetros críticos de la formulación y de los parámetros del proceso de fabricación se identificaron atributos críticos de calidad de un producto farmacológico liposomal AmB complejo. Se observó que la variable más importante fue la temperatura de curado aplicada durante la hidratación y el proceso de microfluidización. El parámetro de formulación de PG:PL y API:PL tuvo un alto impacto, lo que indica la importancia

del proceso de mezcla orgánica. La temperatura de calentamiento durante el secado fue una variable menos importante en el proceso de liofilización.

Ahora bien, identificar un producto farmacéutico complejo y el impacto asociado en los atributos críticos de calidad es esencial para el desarrollo y control de calidad de medicamentos nuevos y genéricos. Rivnay y col. (2019) estudiaron los enfoques de producción de varios pasos y las condiciones de fabricación relacionadas que pueden afectar las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas esenciales del producto farmacéutico final del AmBisome, el antibiótico macrólido de anfotericina B liposomal (AmB) ampliamente adoptado como un producto farmacológico antimicótico. El desafío clave en la fabricación y el análisis de AmB liposomal fue debido a la propensión del fármaco a agregarse, con la baja solubilidad asociada en agua y solventes orgánicos.

Se definieron los parámetros críticos en el proceso de manufactura de liposomas de anfotericina B y se asociaron directamente a un atributo del producto, basados en las 4 etapas: donde en la etapa I consistió en la acidificación adecuada durante la formación de los complejos fármaco-lípido que es condicionante de la calidad al afectar directamente la solubilidad o degradación del principio activo; la etapa II se identifica la temperatura ideal para el proceso con el fin de controlar el tamaño y formación de las partículas liposomales; y la etapa III, la rápida congelación durante la liofilización la cual es crucial para evitar la agregación y aumento del tamaño de los liposomas (Rivnay y col., 2019).

Discusión y Conclusiones

En el uso clínico de la Anfotericina B desoxicolato presenta reacciones adversas agudas relacionadas con la infusión (náuseas, vómitos, escalofríos, fiebre, hipertensión o hipotensión e hipoxia) e importante nefrotoxicidad que a menudo impiden la administración de un ciclo completo o dosis suficientes del medicamento.

Esta situación ha generado en la industria farmacéutica la necesidad de buscar otras tecnologías farmacéuticas al momento de elaborar la anfotericina B y surgieron formulaciones lipídicas que tenían la premisa de ayudar a reducir considerablemente los efectos adversos.

La anfotericina B liposomal presente en el plasma libera lentamente el principio activo dirigiéndose de forma directa hacia los tejidos y el objetivo fúngico a través de la absorción. Mecanismo que no ocurre con las otras formas de Anfotericina B ya que se encuentran libre en sangre y son filtradas a nivel renal, causando daño en las células tubulares renales, favoreciendo a la disminución de la producción de eritropoyetina y alterando también los niveles de hemoglobina, observándose anemia y leucopenia en algunos pacientes.

En cuanto a las reacciones adversas relacionadas con la infusión se observa que el porcentaje de los pacientes con una reacción adversa después de la primera infusión con la forma liposomal fue de 17% vs. 44% para fiebre, y 18% vs. 54% para escalofríos, estos datos con respecto a la forma convencional de anfotericina B (Adler-Moore y col., 2016).

En general las tres diferentes formulaciones solubles en lípidos de anfotericina B se asociaron con un mejor perfil de seguridad para el paciente que la anfotericina B convencional; sin embargo, también existen diferencias significativas dentro de las diferentes formulaciones solubles en lípidos, las cuales se pueden apreciar en la Tabla II.

Debido al mayor tiempo de residencia de los pequeños liposomas bilaminares de anfotericina B liposomal, los niveles de anfotericina B en plasma son mucho más altos en pacientes en tratamiento con anfotericina B liposomal que en aquellos tratados con otras formulaciones de anfotericina. Las partículas más grandes encontradas en las otras formulaciones de anfotericina B, como en la forma coloidal o complejo lipídico son absorbidas rápidamente por los tejidos periféricos, particularmente por las células del sistema reticuloendotelial, aumentando la toxicidad en dichos tejidos. La evidencia expuesta indica que la forma liposomal de anfotericina B es la que presenta un mejor perfil de seguridad y efectividad para el paciente.

Los liposomas tienen la capacidad de transportar fármacos hidrofílicos y lipofílicos. Las sustancias polares o de bajo peso molecular pueden ser agrupadas en el compartimiento acuoso, mientras que las estructuras no polares se intercalan entre las bicapas lipídicas. De esta forma, la versatilidad de los liposomas proporciona gran ayuda en la terapia con fármacos como la Anfotericina B (Botero y col., 2014).

Asimismo, el principio activo tiene la capacidad de prolongar su tiempo de vida media y con él su efecto terapéutico dentro del organismo. También, mejora su absorción, penetración y difusión, al mismo tiempo que estabiliza el principio activo y ofrece una mayor protección contra la oxidación. Además, presenta lípidos que le confieren mayor afinidad a células específicas dentro del organismo. La adición de polímeros ha demostrado un incremento en la biocompatibilidad y control en los perfiles de degradación de la nanoestructura. La finalidad de estas modificaciones permite alcanzar las concentraciones de fármaco requeridas para una mayor eficacia terapéutica en el

Tabla II.

Características de las formulaciones de administración endovenosa de la AnB

Formulación	Formulación Esterol/Lípido	Estructura	Tamaño de partícula	Estabilidad
AnB convencional (AnB-C)	No aplica	Micelas	<10 µm	1 semana de 2-8°C o 24 horas a 27°C
AnB en complejo lipídico (ABCL)	Ninguno / DMPC & DMPG (7:3)*	Discos complejos	1.6-11.1µm (90% de partículas 1.6-6 µm)	15 horas a 2-8°C o 6 horas a 27°C
AnB en dispersión coloidal (ABDC)	Sulfato de colesterol / Ninguno	Cintas	115 nm de diámetro, 4 nm de espesor	24 horas de 2-8°C
AnB en liposomas (AnB-L)	Sulfato de colesterol (5)* EPC & DSPG (10:4)*	Vesículas unilamelares	45-80 nm de diámetro	24 horas de 2-8°C

EPC, Fosfatidilcolina de huevo; DSPG, Diestearoil fosfatidil glicerol; DMPC, Dimiristoil fosfatidilcolina; DMPG, Dimiristoil forfatidilglicerol, ND, No se tiene data.

*Tasa Molar de cada componente, respectivamente (Chapman y col., 2003).

sitio diana y, al mismo tiempo, minimizan los efectos adversos sobre células y tejidos sanos.

Se han comercializado diferentes productos de anfotericina B liposomal en Europa y América del Norte, como el reconocido Ambisome (Gardor), Ambihope (*Abbott Healthcare Pvt. Ltd.*), Ambilip, Amphotin, y Amphotin-LIP (United Biotech), Lambin (*Sun Pharmaceutical Industries Ltd.*) o Lypholyn (Lyka Labs Ltd.); algunos de estos productos tienen la misma composición química (p. ej., AmBisome, AmBiL y Lambin), pero los estudios han demostrado que esto no necesariamente se traducen en igual eficacia y seguridad, lo que sugiere que los diferentes procesos de fabricación pueden alterar las propiedades del producto final (Adler-Moore y col., 2016).

Como medicamento innovador, está AmBisome cuya toxicidad reducida depende de un proceso de fabricación complejo, cuidadosamente controlado y preciso, de varios pasos, que es necesario para garantizar la uniformidad del producto lote a lote. Los ensayos de control de calidad para AmBisome incluyen:

- Pruebas químicas (análisis HPLC).
- Físicas (tamaño de partículas, ausencia de floculación y agregación con el tiempo, estabilidad a diferentes temperaturas).
- Biológicas (actividad *in vitro* contra diferentes hongos, toxicidad *in vivo* a dosis crecientes).

Los estudios han demostrado que incluso alteraciones menores en la relación molar de AmB o fosfolípidos, los cambios en la longitud de la cadena de ácidos grasos

de fosfolípidos, o el tamaño y la carga de los liposomas pueden afectar la asociación entre AmB y la bicapa liposómica, alterando la toxicidad del producto.

Además de los componentes reales de los liposomas, el método utilizado para hacer los liposomas también afectará su toxicidad. Por ejemplo, se encontraron liposomas formados por sonicación que muestran ser más tóxicos para los ratones que los producidos por homogeneización, a pesar de que los liposomas tienen la misma relación molar de lípidos. Otros estudios han demostrado que diversas tensiones en los liposomas, como la filtración estéril durante la producción, la filtración antes del uso, los requisitos de refrigeración y las condiciones de liofilización pueden provocar floculación, fugas del fármaco, la separación de fases y la desintegración de los liposomas (López, 2000).

Dadas las diferencias en toxicidad y eficacia entre los diferentes productos liposomales de AmB y el impacto que estas diferencias pueden tener en la calidad de la atención y la seguridad del paciente, es necesario distinguir entre estos productos tanto en la literatura publicada como en su uso clínico. Para abordar este problema, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) publicó su primer borrador "Guía para la industria sobre fármacos liposomados", en agosto de 2002, y este borrador todavía está bajo revisión (*Draft Guidance for Industry on Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation; Availability*); a su vez la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) estableció que una formulación liposomal debe mostrar equivalencia con el producto innovador en términos de

calidad farmacéutica, farmacocinética y farmacodinámica. Este enfoque a nivel regulatorio es necesario para brindar seguridad a los médicos y pacientes que están recibiendo un tratamiento eficaz y droga segura (https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/biosimilars-eu-information-guide-healthcare-professionals_es.pdf)

En consecuencia, cada cambio realizado en el proceso de fabricación deberá ser evaluado minuciosamente estableciendo parámetros críticos que permitan la reproducibilidad de las características del fármaco innovador.

Las bicapas de liposomas tienden a volverse más permeables a su temperatura de transición o por encima de ella y, por lo tanto, liberan su contenido. El colesterol se puede mezclar con fosfolípidos, y los liposomas de esta forma son menos propensos a liberar su contenido interno. Partiendo de estos principios, los liposomas deben ser formulados con fosfolípidos con temperaturas de transición superiores a 37°C, además de tener una fracción molar alta de colesterol en su composición.

El tipo y calidad de los excipientes juega un papel vital en el desarrollo y optimización de los parámetros del proceso de manufactura (Tabla III). AmBisome presenta en su fórmula fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) y diastearoil fosfatidilglicerol (DSPG), ambos tienen altas temperaturas de transición y se utilizaron además del colesterol, para obtener una formulación estable a 37°C. Por otro lado, la carga negativa en el DSPG interactúa con el grupo amino positivo de anfotericina B, formando un complejo anfotericina B y DSPG en la bicapa de liposomas. Finalmente, estos liposomas se unen a

Tabla III.

Descripción de los componentes de la forma liposomal de Anfotericina B "Ambisome" y su justificación

Componente	Justificación en la fórmula
Anfotericina B	Principio activo con acción antifúngica
Sacarosa	Crioprotector
Fosfatidilcolina de Soja Hidrogenada (HSPC)	Fosfolípido de membrana
Diastearoil Fosfatidilglicerol (DSPG)	Fosfolípido de membrana
Colesterol	Emulsificante
Alfa-tocoferol	Solvente para medicamentos poco solubles, altamente lipofílico.
Succinato Disódico Hexahidrato	Regulador y estabilizador del pH, dado que los tampones succinatos como excipientes causan menos dolor en el lugar de la inyección.

Fuente: Realizado por los autores

las paredes celulares fúngicas, seguido de su tránsito a través de la pared celular fúngica para permitir que la AmB se dirija al ergosterol en la membrana celular fúngica (Adler-Moore y col., 2016).

Para lograr un monitoreo adecuado de las diferentes variables que puedan afectar la calidad del producto es necesario conocer la técnica de manufactura básica para formulación de liposomas de Anfotericina B y establecer los parámetros críticos en el proceso, para esto se toma como referencia el proceso descrito por Liu y col., (2020) (Figura 4).

Los parámetros críticos de proceso y sus controles de proceso asociados son cruciales para el desarrollo de fármacos y la validación del proceso del mismo.

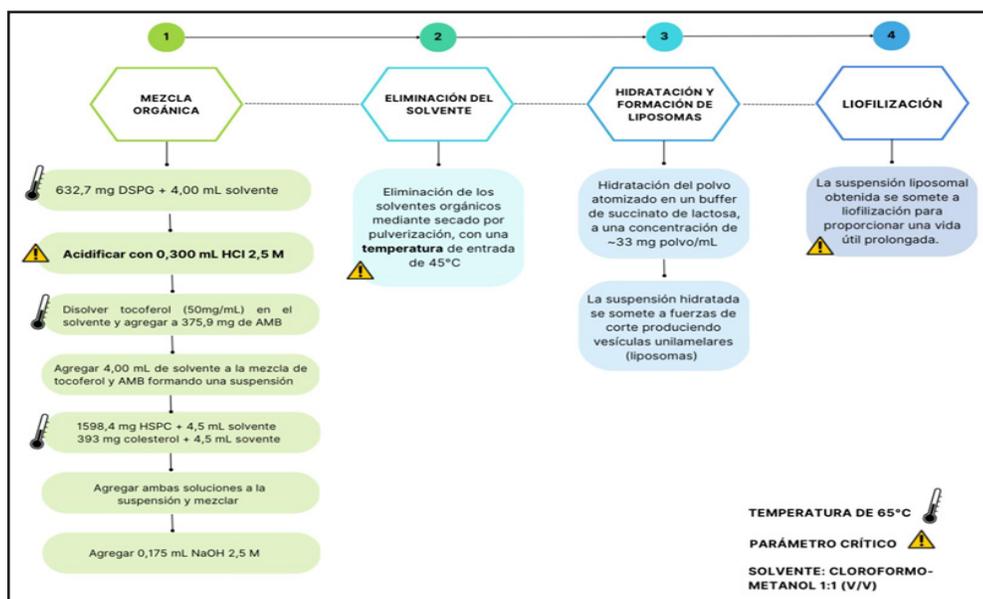


Figura 4. Diagrama del proceso de manufactura de AmBisome.

Fuente: realizado por los autores

Cualquier falla para controlar el proceso puede resultar en dificultades con los sometimientos regulatorios y la liberación de un lote. Una carencia de controles eficientes también puede llevar a extensa pérdida de producto y una pérdida de la confianza regulatoria y del cliente, por lo que estudiar e identificar parámetros críticos resulta de gran interés al momento de la manufactura.

Así, se describen las etapas de manufactura cruciales:

ETAPA I. La etapa de acidificación resulta crucial para el proceso, ya que un medio excesivamente ácido conduce a una rápida degradación del fármaco, mientras que la acidificación insuficiente impide la solubilización completa de la Anfotericina B y la posterior formación de los complejos solubles de fármaco-lípido.

Esto se debe al requerimiento de un complejo neutro de "DSPG-Na⁺" para solubilizar el fármaco y como en

la formulación existe una proporción 1: 2 de AmB y DSPG, respectivamente, el medio requiere un pH ácido. Cuando la concentración de protones supera el equivalente de las especies de DSPG-Na⁺, el complejo formado adquiere carga positiva y la fracción de exceso de HCl queda libre para degradar la AmB. Mientras que, si el medio no es suficientemente ácido, no se genera el complejo neutro "DSPG-Na⁺" que confiere la integración de la AmB al liposoma.

ETAPA II. El tratamiento térmico de forma prolongada a una temperatura de 65°C, justo por encima de la temperatura de transición de la fase lipídica, resulta un factor crítico debido al mantenimiento de una fase líquida de los fosfolípidos y la correcta reorganización estructural de la AmB en la bicapa de la membrana liposomal.

El aumento de la temperatura permite una integración estructural con el resto de los agregados, asegurando su correcto

empaquetamiento y reduciendo la posibilidad de presentar la forma libre de AmB dentro de la formulación.

ETAPA III. Otro factor crítico presente en el proceso de fabricación de liposomas se manifiesta durante el ciclo de liofilización debido a la temperatura que mantiene el producto durante el secado. El proceso de congelación debe ser relativamente rápido para evitar un cambio en el tamaño de las partículas.

Los tamaños de los liposomas oscilan entre 80 y 200 nm y si el proceso de congelación es gradual durante 40 - 60 min, existe un reordenamiento estructural que confiere tamaños de liposomas mucho mayores (1.140nm)

Tal y como se ha podido identificar en la exhaustiva comparación realizada entre las diferentes formas de Anfotericina B, las nuevas tecnologías que permiten encapsulación del principio a través de liposomas trae al paciente grandes beneficios en torno a la seguridad y efectividad; sin embargo el simple hecho de realizar un liposoma no asegura que el mismo posea características ideales, por lo que es de gran importancia lograr identificar y controlar los parámetros críticos de proceso de manufactura que permitan asegurar la reproducibilidad lote a lote y la obtención de un producto de calidad que brinde seguridad y eficacia desde el momento de su desarrollo hasta el instante de la administración directa al paciente (Rivnay y col., 2019).

Recomendaciones

La ciencia ha vivido en las dos últimas décadas una nueva revolución, el paradigma "nano", representado por dos disciplinas nuevas denominadas

nanociencia y nanotecnología. Se basan en el desarrollo de métodos de fabricación precisos y reproducibles para la obtención de estructuras cada vez más pequeñas y que se aplican en una variedad de sectores, como en el farmacéutico con la aparición de los liposomas.

Se insta a la comunidad educativa mantenerse en constante investigación y actualización de programas académicos con las nuevas tecnologías y herramientas disponibles que permiten diseñar sistemas biocompatibles, capaces de transportar y entregar sustancias terapéuticamente activas (drug delivery), en forma específica, hasta el sitio donde deben ejercer su acción. Esta especificidad es fundamental para reducir las dosis y disminuir o, incluso, eliminar los efectos colaterales indeseados, generalmente asociados a la toxicidad de las sustancias respecto de los tejidos sanos.

Por lo que es de gran importancia que desde la academia se siga apostando por el avance y evolución de esta nueva generación de medicamentos que se está desarrollando a partir de la aplicación de la nanotecnología en el campo farmacéutico.

Además, desde el punto de vista metodológico se recomienda realizar estudios experimentales de fabricación de liposomas, tomando en cuenta la aplicación de las distintas técnicas de manufacturas mencionadas en el transcurso de esta investigación con sus respectivos parámetros críticos, con el fin de lograr la caracterización de los mismos y evaluar la calidad según cada método empleado.

Referencias bibliográficas

- Adler-Moore JP, Gangneux JP, Pappas PG. 2016. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. *Medical Mycology* 54(3):223-231.

- Alcántara MR. 2010. La importancia de los hongos. *El ecologista* 66.
- Botero JP, Restrepo A. 2015. Amphotericin B deoxycholate versus liposomal amphotericin B: effects on kidney function. *Cochrane Library* (11):1-51.
- Botero MC, Puentes-Herrera M, Cortés JA. 2014. Formas lipídicas de anfotericina. *Rev Chil Infectol* 31(5): 518-527.
- Chapman SW, Cleary JD, Rogers PD. 2003. Amphotericin B. En Dismukes WE, Pappas PG y Sobel JD. *Clinical Mycology*. USA. Oxford University Press. 33-48.
- Espinoza C. Análisis comparativo de seguridad entre anfotericina B convencional y anfotericina B complejo lipídico en pacientes del hospital nacional Edgardo Rebagliati Martins en el período 2011-2012. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Perú, 2014.
- Falci D, da Rosa F, Pasqualotto A. 2015. Hematological toxicities associated with amphotericin B formulations Leukemia & Lymphoma Early Online: 1-6 (1):1-6.
- Gregorí B. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia* 39(2):1-15.
- FDA (Food Drug Administration), Draft Guidance for Industry on Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation; Availability. 2022. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> or <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/default.htm>.
- Liu H, Rivnay B, Avery, K Hye Myung J, Kozak D, Landrau N, Nivorozhkin A, Ashraf M, Yoon S. 2020. Optimization of the manufacturing process of a complex amphotericin B liposomal formulation using quality by design approach. *International J Pharmaceutics* 585:119473.
- Johansen H, Gøtzsche P. 2017. Amphotericin B lipid soluble formulations versus amphotericin B in cancer patients with neutropenia. *Cochrane Library* (3):1-28.
- López R. 2000. Anfotericina B: Determinación en diversos fluidos biológicos por cromatografía líquida. Aplicación de estudios farmacocinéticos y de estabilidad química. [Tesis doctoral]. Barcelona; Unidad de Monitorización de Fármacos del Servicio de Bioquímica del Hospital General Vall d'Hebron de Barcelona. Disponible: <https://www.tesisenred.net/handle/10803/3459#page=1>.
- Pemán J, Salavert M. 2012. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Micología Clínica* 30 (2):90-98.
- Rivera E. 2020. Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de Facultad de Medicina UNAM* 63 (2): 7-17.
- Rivnay B, Wakim J, Avery K, Petrochenko P, Myung JH, Kozak D, Yoon S, Landrau N, Nivorozhkin A. 2019. Critical process parameters in manufacturing of liposomal formulations of amphotericin B. *International J Pharmaceutics* 565: 447-457.
- Suberviola B. 2022. Seguridad clínica de la anfotericina B liposomal. *Revista Iberoamericana de Micología* 38(2):56-60.
- Vogelsinger H, Weiler S, Djanani A, Kountchev J, Bellmann R, Wiedermann C, Bellmann R. 2006. Amphotericin B tissue distribution in autopsy material after treatment with liposomal amphotericin B and amphotericin B colloidal dispersion. *J Antimicrob Chemother* (57):1153-1160.
- Olson JA, Schwartz JA, Hahka D, Nguyen N, Bunch T, Jensen GM, Adler-Moore JP. 2015. Toxicity and efficacy differences between liposomal amphotericin B formulations in uninfected and *Aspergillus fumigatus* infected mice. *Med Mycol* 53:107-118.
- Romero EL, Morilla MJ. 2008. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. *Expert Opin Drug Deliv* 5(7):805-23.