



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Estudios de estabilidad de un producto constituido por un
sistema nanoacarreador que contiene IL-2 para el
tratamiento del cáncer cérvico uterino.**

AREA: TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

**Directora: Dra. María Teresa Corona Ortega
Asesor: Dr. Ramón Soto Vázquez**

**Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimentación
Zaragoza
L-4 Laboratorio de Oncología Celular**

**TESIS EXPERIMENTAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:
RAÚL JUÁREZ LÓPEZ**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ FES-Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la Dra. María Teresa Corona Ortega y la asesoría del Dr. Ramón Soto Vázquez. El trabajo fue financiado por los proyectos ICyT PIUTE 10-100 y DGAPA-PAPIIT IN228111.



“Oda a la farmacia”

“Todo en tu ámbito claro, en tu universidad de frascos y cajones espera la hora de la batalla de nuestro cuerpo. Farmacia, iglesia de los desamparados con un pequeño dios en cada píldora. Que sean victorias de la vida, de toda la vida humana contra la poderosa muerte tus victorias y así serán mejores tus laureles, serán más olorosos los sulfatos, más azul, el azul de metileno y más dulce la paz de la quinina”

Pablo Neruda



**Dedicado a mis abuelos, Adolfo López[†] y Roberto Alonso[†].
Gracias por estar desde el principio y hasta el final de este proyecto.**



Agradecimientos

Al arquitecto de la vida, por darme todos los medios para cumplir mis objetivos, por estar presente en todos mis triunfos y fracasos. Os amo y en voz confió.

A mis padres, Juanita López y Miguel Ángel G. Juárez. Gracias por todo su apoyo a lo largo de mi vida, que esta tesis quede como evidencia de mi infinito amor por ustedes.

A la Universidad Nacional Autónoma De México, en especial a la FES Zaragoza. Gracias por ser mi segundo hogar y permitirme ser parte de esta comunidad universitaria.

Al Dr. Ramón Soto, por permitirme participar es este proyecto, por la oportunidad de desarrollarme académicamente y profesionalmente. Gracias por ser un gran amigo.

A la Dra. Ma. Teresa Corona, por dejarme ser parte de este proyecto, por su paciencia en el desarrollo de este trabajo. Gracias por todo el conocimiento transmitido.

A mis hermanos, Edgar Juárez, por estudiar junto a mi esta carrera, por que el sabe los sacrificios y las alegrías que esto implica. Omar Juárez, por cubrir con éxito todas mis responsabilidades cuando tuve que ausentarme de casa.

A mis amigos, Ivan Velazco y Julio Acosta, gracias por todas las experiencias compartidas dentro y fuera de las aulas, por todo en conocimiento compartido.

A todas las personas que apoyaron de manera directa o indirecta, gracias por confiar en mí y por todas sus palabras de aliento.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	4
Liposomas.....	4
• Definición	6
• Nomenclatura utilizada en liposomas	8
• Métodos de preparación de liposomas.....	10
• Tipos de liposomas.....	13
• Usos de los liposomas	15
Citocinas.....	18
Interleucina-2 (IL-2)	19
• Propiedades	20
• Acción farmacológica.....	20
• Toxicidad	20
Estudios de estabilidad	21
• Objetivo de los estudios de estabilidad.....	22
• Factores que influyen en la estabilidad	23
• Definiciones	24
• ICHQ5C Calidad para Productos Biotecnológicos	27
Citometría de flujo.....	34
• Generalidades	34
• Características del análisis por citometría de flujo	37



• Áreas de aplicación de la citometría de flujo	39
Ensayos de inmunoabsorbancia.....	41
• Ensayos de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA).....	42
• ELISA indirecta	44
• ELISA competitiva.....	44
• ELISA de sándwich	45
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	47
OBJETIVOS	48
HIPÓTESIS.....	49
PROTOCOLO DE ESTABILIDAD DE ACUERDO A LA NOM-073	50
MATERIAL	54
MÉTODO	56
Fabricación de liposomas	56
Acondicionamiento de estufa de estabilidad	57
Muestreo y análisis por medio de citometría de flujo	57
Acondicionamiento del citometro BD FACSDiVa	58
Determinación de la morfología de los liposomas por microscopía electrónica de trasmisión.....	59
Muestreo y análisis por medio de inmunoensayo	60
Cuantificación de IL-2 mediante técnica de ELISA.	60
RESULTADOS.....	63
Citometria. Estabilidad física.....	64



Inmunoensayo, ELISA. Estabilidad química.....	86
Fotografías de microscopia electrónica de transmisión a 80K	99
ANÁLISIS DE RESULTADOS	101
CONCLUSIONES.....	106
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107



INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de un nuevo medicamento y el desarrollo posterior del mismo, son las dos fases, que condicionan lograr un nuevo producto útil en la terapéutica, la creación de una nueva entidad terapéutica es un proceso largo y costoso que pone a prueba a la creatividad de un equipo de trabajo y que requiere una importante acumulación de recursos tecnológicos y humanos¹.

Los principios activos son en general inadecuados para su administración al organismo, sin que estos sean inducidos en un vector, por lo que la farmacia ha desarrollado las llamadas formas farmacéuticas, adaptadas a las diferentes vías de administración. Toda la galénica tradicional ha constituido un arte asombroso a lo largo de muchos siglos pero la moderna revolución farmacéutica ha permitido desarrollar nuevas formas farmacéuticas en donde ha incursionado con mucho éxito la nanotecnología y esto hace que la “Tecnología Farmacéutica”, sea considerada actualmente como una verdadera ciencia. La última transformación profunda que ha sufrido la Tecnología Farmacéutica es una consecuencia de la necesidad de disponer de nuevas formas de dosificación adecuadas para el creciente número de moléculas terapéuticas provenientes del desarrollo de la Biotecnología².

El cáncer cérvico uterino es una enfermedad con una incidencia muy elevada, actualmente se calcula que a nivel mundial cada año se diagnostican 466 000 nuevos casos de estos, 231 000 mueren por esta enfermedad. El 80% de los decesos proceden de países en vías de desarrollo. Se sabe que el tratamiento de una mujer con esta patología en Estados Unidos tiene un costo de 2 600 dólares, esto limita aun más su rápida atención³.



La falta de acceso a los servicios de análisis y tratamiento adecuados de uno de los tipos de cáncer más prevenible, detectable y tratable, se ha convertido en una causa importante de mortalidad entre las mujeres, particularmente en mujeres de bajos recursos económicos de los países en desarrollo. Si bien la tasa de mortalidad por cáncer cérvico uterino en Norte América ha disminuido en los últimos 10 años, en los países en desarrollo de América, permanece constante. Esa realidad refleja la necesidad de un nuevo planteamiento del cáncer cérvico uterino, que enfatice la prevención y los aspectos positivos de los análisis y la detección temprana³.

En otro orden de ideas existen diversos fármacos que podrían ser útiles en el tratamiento de este tipo de cáncer; sin embargo, poseen desventajas asociadas a su empleo, como la distribución en el organismo según sus propiedades físicas, tales como la solubilidad, coeficiente de partición y carga. En consecuencia, los fármacos pueden alcanzar gran variedad de órganos en los cuales puede que se encuentren fuera de su intervalo terapéutico, que sean inactivos, o que su acción sea indeseada o nociva, y por tanto, con efectos secundarios negativos⁴.

La biotecnología abre la posibilidad de suministrar dosis de medicamentos más bajas al paciente para conseguir los mismos efectos, al mejorarse la estabilidad física y química, el tiempo de vida y la protección de estos medicamentos frente a los tradicionales. La formulación de fármacos en forma nanoestructurada aumenta su solubilidad y eficacia, por lo que ya existen en el mercado varios fármacos de este tipo y muchos otros están en desarrollo.



Entre ellos, cabe destacar la utilización de nanopartículas de material cerámico, nanocápsulas, dendrímeros, liposomas o micelas. Estos transportadores están jugando un papel crucial en el desarrollo de tecnologías de liberación de fármacos específicamente en el lugar dañado o enfermo, permitiendo transportar fármacos, vacunas y ADN a las células y tejidos afectados, pero sin interferir negativamente en otras zonas del cuerpo. Por ejemplo, en el caso de los fármacos anti cancerígenos, el uso de nanoestructuras conduce a dosis administradas menores que las típicamente aplicadas en quimioterapia y, si la sustancia se dirige de modo directo al tumor, las cantidades efectivas allí aplicadas pueden ser entre diez y mil veces mayores que las que llegan a destino por las vías habituales. Se evitan de este modo los efectos secundarios no deseados típicos de la quimioterapia⁵.

En el presente trabajo se utiliza como fármaco la Interleucina 2 (IL-2) encapsulada en un sistema nanoacareador (liposomas), puesto a que ha demostrado tener una fuerte actividad inmunorreguladora y antitumoral; sin embargo, debido a que sus efectos adversos pueden resultar muy graves, proponemos el uso de un sistema nanoacarreador que consiste en nanoliposomas de 50 nm de diámetro promedio que encapsulan y exponen IL-2 como una alternativa segura y eficaz para el tratamiento del cáncer cérvico uterino. Particularmente se pretende evaluar la estabilidad física (complejidad y tamaño) y la química (cantidad retenida) del sistema nanoacarreador con IL-2 durante un período de seis meses con la finalidad de evidenciar que el producto farmacéutico conserva sus características basales respecto al tiempo bajo la influencia de factores ambientales.



MARCO TEÓRICO

Liposomas

Los liposomas fueron descubiertos en el año de 1965 por Bangham y colaboradores, quienes constataron que ciertos lípidos pueden formar estructuras membranosas artificiales cuando están en presencia de un exceso de agua. Estas estructuras vesiculares, altamente organizadas, están constituidas por una pared formada por lamelas o bicapas lipídicas concéntricas que están separadas por un número igual de espacios de contenido acuoso. Para su elaboración habitualmente se utilizan fosfolípidos, con o sin la incorporación de colesterol o de otros materiales, introducidos en la pared del liposoma con el fin de dotar a las partículas de alguna propiedad particular, ejemplo carga superficial.

Inicialmente estas vesículas se utilizaron como modelo de membranas biológicas dada la similitud que presenta con ellas, pero teniendo en cuenta su versatilidad estructural, así como su carácter biodegradable y biocompatible se planteó su utilización en *Drug Delivery* siendo espectacular el número de trabajos publicados sobre la utilización de liposomas en este campo desde que, al principio de los años 70's Gregoriadis inició el estudio sobre el potencial que presentan como sistemas de liberación de fármacos y otras moléculas bioactivas².

La versatilidad de los liposomas se refleja en primer lugar, en el hecho de que son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también de carácter anfifílico. Además, sus propiedades físicas como la carga superficial, el tamaño, la permeabilidad/rigidez de la pared o su capacidad de carga; pueden ser fácilmente modulables.



Por último utilizando lípidos funcionalizados, se pueden unir anticuerpos u otros ligandos a la superficie de estas vesículas, que se convierten en sistemas de transporte con capacidad para acceder a un tejido específico.

A pesar de todas estas ventajas, es indudable que también tienen limitaciones en cuanto a su utilización como sistemas de liberación, lo que sin duda explica que todavía no sea muy importante el número de formulaciones aprobadas y comercializadas para su uso en humanos. Entre las limitaciones destaca su comportamiento desfavorable en el medio gastrointestinal, lo que limita las posibilidades que puedan ser administrados por vía oral, excepto que se introduzcan con algún recubrimiento. Como consecuencia la mayor parte de trabajos publicados se refiere a su utilización por vías de administración parenterales, además de un grupo importante dedicado a explorar el interés que pueden tener como vehículos para la administración tópica cutánea y la administración transdérmica. Más recientemente, la posibilidad de administrar liposomas en forma de aerosol por vía pulmonar ha sido objeto de estudio, no solo para en tratamiento de enfermedades que cursan a nivel pulmonar, sino también para la administración de fármacos que actúen a nivel sistémico⁹.



- **Definición**

Los liposomas son vesículas compuestas por una o varias bicapas de lípidos anfipáticos, los cuales delimitan uno o varios compartimentos acuosos, tienen la propiedad de adoptar espontáneamente la configuración en bicapa cuando se encuentran en un medio acuoso. Tienen básicamente la misma estructura de las membranas celulares. Los liposomas se pueden formar con lípidos anfipáticos naturales y/o sintéticos, su principal constituyente es la fosfatidilcolina, pero se pueden utilizar otros lípidos o mezcla de ellos, que pueden conferir carga positiva o negativa. La inclusión de carga aumenta notablemente el volumen acuoso en el interior de la vesícula, debido a la repulsión electrostática entre bicapas adyacentes. La carga también afecta la interacción de los liposomas con las células¹.

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que poseen una región hidrofílica (cabeza polar), compuesta por un grupo fosfato y una molécula que le da nombre al grupo de cabeza; el sustituyente más sencillo es un hidrógeno formando ácido fosfático y en el caso de la fosfatidilcolina es una molécula de colina. El grupo de cabeza se encuentra esterificado al carbono 3 de una molécula de glicerol y en los carbonos 1 y 2 se encuentran largas cadenas de ácidos grasos (extremo apolar)¹⁰.

Debido a las interacciones de las dos cadenas de ácidos grasos, una estructura que adoptan los fosfolípidos al contacto con el agua es la de bicapa y en su forma más estable, se repliegan formando estructuras cerradas llamadas liposomas que encierran parte de la suspensión acuosa. Además de fosfolípidos, otros compuestos pueden formar parte de la estructura de los liposomas, como es el caso del colesterol, que también está presente en la mayoría de las membranas naturales.



El colesterol es una estructura que contiene 4 anillos cíclicos que reducen la capacidad de movimiento de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos confiriendo rigidez a las vesículas o a las membranas lo que influye principalmente en su estabilidad y permeabilidad. Por otro lado, también se pueden incluir en la composición lipídica de los liposomas, moléculas que aporten cargas a la estructura como son el fosfatidilglicerol y la fosfatidilserina que confieren carga negativa; o la estearilamina, que confiere carga positiva a las vesículas⁶.

En general los componentes de los liposomas se pueden resumir en los siguientes:

1. Fosfolípidos
2. Colesterol
3. Lípidos iónicos
 - i. Aniónicos: ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, diacetilfosfato.
 - ii. Catiónicos: estearilamina, esfingomielina.
4. Otros: esteroides, glucolípidos, polímeros sintéticos o proteínas.

Los fosfolípidos son prácticamente insolubles en aceites fríos tanto animales como vegetales, disolventes polares y agua. Son solubles en hidrocarburos alifáticos y aromáticos, hidrocarburos halogenados (cloroformo), aceites minerales, ácidos grasos, éter de petróleo; en agua adquieren una forma de agregación diferente en función del pH, temperatura, fuerza iónica, presencia de sustancias cargadas y colesterol. La estructura en bicapa se da de manera rápida y espontánea en el agua y se debe a su carácter anfipático¹¹.

Por último, el grado de fluidez de los liposomas es conferido por su composición, por la presencia de colesterol y por las características de sus fosfolípidos pues depende del largo de las cadenas hidrocarbonadas, las insaturaciones y las fuerzas de Van der Waals entre ellas lo que determina la temperatura de transición sólido-líquido y por tanto la estabilidad de las vesículas a diferentes temperaturas⁷.

- **Nomenclatura utilizada en liposomas**

Para referirse a los distintos tipos de liposomas se puede recurrir al criterio que tiene en cuenta su tamaño y el número de bicapas o de lamelas que conforman la pared de su estructura vesicular (Tabla 1). Otra alternativa podría referirse al procedimiento por el que han sido obtenidos (Tabla 2).

Tabla 1. Abreviaturas de los nombres de liposomas de acuerdo a su tamaño y estructura vesicular

Abreviatura	Nombre completo/lamellaridad	Tamaño
MLV	Vesículas multilaminares	> 0.5 μm
OLV	Vesículas oligolamelares	0.1 – 1 μm
UV	Vesículas unilamelares	Todos los rangos de tamaños
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas	40-100 nm
LUV	Vesículas unilamelares grandes	> 400nm
GUV	Vesículas unilamelares gigantes	> 1 μm
MVV	Vesículas multivesiculares	> 1 μm



Tabla 2. Abreviaturas de los nombres de liposomas de acuerdo a su método de preparación.

Abreviatura	Nombre completo/método de preparación
REV	Vesículas uní u oligolamelares obtenidas por evaporación en fase reversa
MLV-REV	Vesículas multilamelares obtenidas por evaporación en fase reversa
SPLV	Vesículas estables plurilamelares
FATMLV	Vesículas multilamelares obtenidas por ciclos repetidos de congelación/descongelación
VET	Vesículas obtenidas por extrusión
LUVET	Vesículas unilamelares grandes obtenidas por extrusión
DRV	Vesículas obtenidas por deshidratación/rehidratación



- **Métodos de preparación de liposomas**

Los liposomas se pueden obtener aplicando distintas metodologías que conducen a la formación de vesículas con características diferentes en función del procedimiento aplicado (tamaño y distribución de tamaños, lameralidad, eficacia de asociación), lo que sugiere que diversos mecanismos están implícitos en el proceso de formación.

El componente mayoritario de estas estructuras son lípidos, en particular fosfolípidos que, cuando se encuentran en un medio acuoso a una temperatura próxima a su temperatura de transición de fase, tiene la capacidad de formar estas estructuras vesiculares cerradas incluso de manera espontánea. Si la situación de partida es un *film lipídico que se hidrata* con una solución acuosa mediante la agitación mecánica, entonces lo que se obtiene son vesículas multilaminares de tamaño relativamente grande y heterogéneo, siendo éste además de el primer procedimiento de fabricación propuesto, también es el más sencillo y popular⁸.

Partiendo de estas vesículas multilaminares y aplicando ultrasonidos, se pueden obtener liposomas unilaminares de tamaño pequeño tal como propusieron por primera vez en 1962 Saunders y colaboradores. Para controlar el diámetro de la vesícula, la lameralidad y también la homogeneidad del tamaño de los MLV obtenidos por hidratación de una película de fosfolípidos, es posible aplicar un procedimiento de extrusión a la suspensión heterogénea de vesículas MLV, que consiste en pasarlas a través de filtros de membrana de policarbonato con un tamaño de poro determinado.



El número de veces que se repita esta operación, así como el diámetro del poro que se utiliza para llevar a cabo la operación, determina la lameralidad y la dispersión de tamaños de la suspensión final de liposomas.

La formación de películas de lípidos que representa la primera etapa de la formación de liposomas MLV en todos los casos anteriormente citados, requiere el uso importante de grandes cantidades de disolventes orgánicos que plantean importantes problemas de toxicidad ya que puede comprometerse la seguridad del producto final obtenido, además de suponer un inconveniente serio para la obtención de liposomas a nivel industrial dado el impacto ambiental que supone el empleo de disolventes. Como consecuencia se han propuesto procedimientos alternativos que requieren el uso de disolventes menos tóxicos como el etanol, en los que la formación de liposomas se produce por inyección de una solución etanólica de lípidos en un volumen acuoso de volumen considerablemente mayor. De esta manera los liposomas se forman espontáneamente, pudiendo controlarse mínimamente sus características a través de la relación de volúmenes de etanol/agua, la velocidad de inyección o la concentración inicial de lípidos utilizada. El etanol utilizado se puede eliminar fácilmente, si bien lo que limita en la práctica el uso de esta técnica es la posible inactivación de muchas biomoléculas en presencia de etanol⁹.

Al final de la década de los 70's, Szoka y Papahadjopoulos desarrollaron un procedimiento de preparación de liposomas al que denominaron de evaporación de fase reversa, mediante el cual se pueden obtener vesículas con un espacio central acuoso mucho más voluminoso. En este método se parte de una disolución de fosfolípidos en éter etílico que se mezcla con una fase acuosa en una relación de volúmenes 1:3 (fase orgánica/fase acuosa). Esta mezcla se emulsifica por sonicación obteniéndose una suspensión de



micelas invertidas. Posteriormente se elimina el éter por presión reducida, produciéndose al mismo tiempo una agregación de dichas micelas que conduce a la formación de una estructura tipo gel, la cual finalmente acaba por romper cuando se sigue incrementando el grado de vacío aplicado para lograr la completa eliminación del disolvente orgánico. En todo este proceso las monocapas lipídicas que constituyen las micelas se sitúan lo suficientemente cerca unas de otras, para dar lugar a las bicapas lipídicas que constituyen la pared de los liposomas. Las vesículas formadas de esta manera son de tipo unilaminar u oligolaminar con un tamaño medio a 500nm aunque bastante heterogéneo. La fuerza iónica de la solución acuosa determina la capacidad de encapsulación que van a tener las vesículas, la cual puede oscilar entre 20 y 65% (a menor fuerza iónica mayor capacidad de encapsulación). Posteriormente el mismo Szoka, propuso la extrusión secuencial de los liposomas obtenidos en fase reversa, como alternativa para reducir el tamaño y la polidispersión, si bien la eficacia de encapsulación disminuye en la relación a las vesículas sin extruir².

Vesículas de tipo unilaminar pequeño se pueden obtener a partir de MLV por una técnica de microfluidificación, la cual consiste en producir colisiones entre liposomas a hacerlos pasar rápidamente por presión a través de filtros de membrana de 5 μm de diámetro. Este proceso se repite una serie de veces, de manera que se estima que después de 10 ciclos se pueden obtener SUV de tamaño inferior a 100nm. La liofilización de vesículas SUV seguida de una fase de rehidratación se ha propuesto como un procedimiento sencillo para obtener liposomas con elevada capacidad de encapsulación. Este método ha sido recientemente modificado de manera que es posible obtener liposomas de tamaño submicrométrico y con una dispersión muy estrecha, estériles y libres de pirógenos.



Finalmente es posible obtener liposomas por un procedimiento llamado “eliminación de detergente”, a partir de micelas mixtas formadas por una combinación de fosfolípidos y un detergente que preferiblemente debe presentar una concentración crítica micelar elevada y un bajo índice de agregación. Para la eliminación del detergente que conduce a la formación de las vesículas, se puede acudir a una técnica de diálisis, aunque también es posible hacerlo mediante cromatografía de exclusión en gel por procedimiento de adsorción de detergente sobre partillas de resina hidrofóbicas².

- **Tipos de liposomas**

Además de la clasificación habitual de los liposomas atendiendo a sus características fisicoquímicas o al proceso por los que han sido fabricados es posible realizar otra clasificación teniendo en cuenta el comportamiento que previsiblemente tendrán los liposomas como consecuencia de las modificaciones que, con diferentes fines, se haya podido introducir en su estructura¹¹. Desde ese punto de vista, se podrán distinguir los siguientes tipos de liposomas:

Liposomas convencionales

Son los liposomas clásicos de superficie hidrofóbica, compuestos por ejemplo de fosfatidilcolina y colesterol que, tras su administración intravenosa son rápidamente recubiertos por las proteínas plasmáticas y a continuación eliminados de la circulación tras ser fagocitados por las células del RES.



Liposomas de circulación prolongada (stealth liposomes)

La presencia de PEG en la superficie de los liposomas incrementa su hidrofilia, dando lugar a una reducción en la interacción con proteínas plasmáticas y lipoproteínas. Esta modificación de los liposomas a la cual, teniendo en cuenta el material utilizado se ha dado en llamar pegilación, sirve para conseguir dos funciones importantes: la primera, un incremento en la biodisponibilidad de los fármacos encapsulados y la segunda que el proceso de liberación sea más lento y que se minimice la toxicidad y los efectos secundarios. Además del PEG, otros polímeros como la poliacrilamida, el alcohol polivinílico o la polivinilpirrolidona, han sido utilizados para lograr los mismos objetivos.

Es destacable el comportamiento de los liposomas pegilados en su capacidad para experimentar un proceso de extravasación en determinados lugares en los que se produce un incremento de la permeabilidad de la pared de los vasos sanguíneos, como puede ocurrir por ejemplo en zonas en las que hay un proceso infeccioso o una inflamación.

Liposomas catiónicos

Su principal aplicación es la vehicularización de material genético. Los lípidos catiónicos constitutivos de estos liposomas neutralizan la carga negativa del ADN formando así una estructura compacta aunque diferente de la estructura vesicular típica de los liposomas. Estos complejos resultantes de la infección del ADN y los lípidos catiónicos proporcionan una protección al material genético y promueven la internalización y la expresión del plásmido en el interior celular⁸.



Inmunoliposomas

Estos liposomas tienen la capacidad de dirigirse específicamente y reconocer algunas células y órganos del cuerpo, gracias a la presencia de determinados elementos introducidos en el diseño de su estructura, como pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos a la superficie de los liposomas.

La elección del antígeno diana, la función del anticuerpo y el tipo de linker utilizado para lograr su unión a la superficie, son factores que requieren un análisis exhaustivo en el diseño de este tipo de liposomas.

- **Usos de los liposomas**

Se pueden utilizar como vehículos genéticos para transferir ADN al interior de las células, para realizar terapia génica o desarrollar vacuna de ADN. Además se puede utilizar como acarreadores de drogas no polares o polares, por la característica anfipática de los lípidos. Otro de sus usos es para acarrear proteínas por ejemplo, la hemoglobina, formando un tipo de sangre artificial sin problemas de grupo sanguíneo, para diagnóstico cuando portan un marcador⁸.

Ha sido notable la utilización de liposomas para encapsular medicamentos antitumorales, por ejemplo se ha encapsulado muramil tripéptido, en otras investigaciones se ha encapsulado fármacos anti-VIH dirigidos a monocitos macrófagos humanos. Adicionalmente se ha avanzado en el estudio acerca del efecto en los macrófagos de los medicamentos encapsulados en liposomas y se ha demostrado que pueden estar involucrados en la inducción de la secreción de citocinas, clave para la regresión de tumores,



este hallazgo sirve como base para la realización de nuevas estrategias de combate contra el cáncer, una de ellas ha sido para transportar genes que codifican para diferentes citocinas, con la finalidad de que sean expresados por las células tumorales.

Otro uso de los liposomas surge en la práctica clínica, donde son aplicados en el rastro linfático por destello donde se utilizan macropartículas marcadas que se distribuyen en la corriente linfática o en la creación de vacunas donde se encapsula el antígeno para generar respuesta de los linfocitos T⁶.

La importancia del uso de liposomas como acarreador radica en la modificación de la farmacocinética de los principios activos, es por ello que ha sido notable su uso en la encapsulación de medicamentos antitumorales y algunas citocinas como la IL-1 y la IL-2⁸.

Aplicaciones en medicina

Los liposomas han sido objeto de un considerable interés en el campo de la medicina, bien con fines terapéuticos o como herramientas de diagnóstico. Sus propiedades fisicoquímicas, como composición tamaño y estabilidad del vehículo pueden ser fácilmente modificados dependiendo de la aplicación concreta. Los liposomas han sido utilizados para proteger moléculas sensibles, para mejorar la captura intracelular y para cambiar el perfil farmacocinético y la biodistribución (tanto temporal como espacial) de la molécula encapsulada¹⁰. Tabla 3. Desde el punto de vista de administración, los liposomas pueden ser formulados como suspensiones líquidas inyectables, aerosoles, cremas o geles, que pueden ser administrados por diferentes vías, si bien lo más frecuente es que sean por inyección intravenosa¹².

Tabla 3. Medicamentos comercializados que contienen liposomas².

Vía de administración / Producto /Estatus	Molécula activa	Indicaciones
Administración Intravenosa		
Ambisome®	Anfotericina B	Infecciones fúngicas sistémicas
Daunosome®	Daunorubicina citrato	Sarcoma de Kaposi
Mikasome®	Amikacina	Infecciones bacterianas graves
Doxil/Caelix	Doxorubicina sulfato	Sarcoma de Kaposi y cáncer de ovario refractario
SPI 077 Fase II	Cisplatino	Carcinoma de células escamosas de cabeza
Myocet ®/ Evacet	Daunorubicina citrato	Cáncer de mama metastásico
Ventus® Fase III	Prostaglandina E1	Síndrome de distress respiratorio agudo
OSI 211 Fase II	Lurtotecan	Leucemia mieloide refractaria
Marqibo®	Vincristina	Linfoma no Hodking
Annamicina liposomal Fase II/III	Annamicina	Cáncer de mama
Aroplatin/Plantar fase I	Derivados del platino	Mesotelinoma



Citocinas

Las citocinas son un grupo diverso de proteínas y glicoproteínas reguladoras, su clasificación sigue siendo confusa. Estas moléculas son producidas normalmente en pequeñas cantidades por el cuerpo, actúan como comunicadores entre varias células, induciendo el efecto mediante la unión a receptores específicos que se encuentran en la superficie celular. La mayoría de las citocinas actúan sobre o son producidas por leucocitos, que constituyen el sistema inmune y el sistema inflamatorio, de este modo juegan un papel central en la regulación de ambos procesos y otros procesos relacionados, tal como la hematopoyesis¹³. El término citocina fue usado por primera vez a mediados de los 70s, para describir a los polipéptidos que controlan los factores de crecimiento en la diferenciación y regulación de la células del sistema inmune¹⁴.

Los interferones (IFNs) y las interleucinas (ILs) representan las principales familias de polipéptidos que se clasificaron como citocinas en ese momento, posteriormente se introdujeron términos adicionales que incluyeron a las linfoquinas (citocinas tal como la interleucina 2 y el interferón gama, producidos por linfocitos) y las monocinas (citocinas tal como el factor de necrosis tumoral alfa producido por monocitos), pero esta clasificación es inapropiada ya que la mayoría de citocinas son producidas por diversos tipos de células. La clasificación inicial de algunas citocinas se realizó en base a su actividad biológica, pero resultó un mecanismo de clasificación insatisfactoria ya que la mayoría de citocinas muestra un amplio rango de actividades biológicas⁹.



Las citocinas constituyen un grupo importante de sustancias biofarmacéuticas. Como coordinadoras de las respuestas inmunes e inflamatorias, la manipulación de la actividad de las citocinas puede tener una mayor influencia en la respuesta de los cuerpos a una variedad de condiciones médicas⁹.

Interleucina-2 (IL-2)

La interleucina-2 (IL-2) es una citocina producida en forma natural, fue identificada por primera vez en 1976. Es secretada por las células CD4 para controlar la función y el crecimiento de distintos tipos de células. Sirve como estimulante del crecimiento de los linfocitos T activados, siendo denominada al inicio "factor de crecimiento de las células T"; al conocer mejor su acción biológica se observó que no sólo estimulaba el crecimiento de los linfocitos T activados, sino que también aumentaba la respuesta inmune mediante la activación de otras células de la fórmula blanca, linfocitos T citotóxicos, linfocitos B y células naturales asesinas, por lo que se cambió su nombre a interleucina-2.

Comercialmente la IL-2 es fabricada por tecnología recombinante y está autorizada por la FDA para el tratamiento de metástasis del cáncer renal, las únicas sustancias aceptadas para el tratamiento de melanoma maligno avanzado son el interferón alfa y la interleucina-2¹⁵.



- **Propiedades**

- Nombre del principio activo: Interleucina-2 (IL-2).
- Fórmula condensada: $C_{693} H_{1118} N_{178} O_{203} S_7$
- Peso molecular: 15415.9 Da
- Propiedades químicas: Sensible a tripsinas, quimiotripsina. Estable en 2-mercaptoetanol, urea (2-4mol/L).
- Propiedades fisicoquímicas: Estable a pH 3-10; a 56° C por 60 min. Inestable después de 30 min a 70° C¹⁶.

- **Acción farmacológica**

- Factor de crecimiento de células T citotóxicas.
- Activación de linfocitos y células NK (natural killers).
- Potencializa la liberación de interferón gama, IL-1 y granulocitos (factores de necrosis tumoral).
- Promueve secreción de inmunoglobulinas.
- Aumenta la actividad antitumoral de macrófagos¹⁷.

- **Toxicidad**

- Dosis mayores a 100,000 Unidades/Kg cada 8 hrs están asociados a efectos adversos.
- Hipotensión, edema periférico y fallo renal.
- Las dosis mayores a 600,000 Unidades/Kg c/8hrs requiere la administración de agonistas b-adrenérgicos. Provocan daño hepático, fallo renal (insuficiencia renal) y cuando no se tratan estos efectos adversos pueden provocar una congestión pulmonar e incluso la insuficiencia cardíaca congestiva¹⁷.



Estudios de estabilidad

Hoy en día, el estudio y la determinación de la estabilidad de los medicamentos se han convertido en una necesidad de la industria farmacéutica moderna, a fin de poder asegurar la identidad, efectividad, potencia, inocuidad y pureza de los productos hasta el momento de su uso. El hecho de que un fármaco sea inofensivo, no significa que sus productos de degradación también lo sean, por ello es necesario conocer si durante el proceso de envejecimiento aparecen o no productos tóxicos de degradación que pudiera afectar la salud del paciente.

El tema de la estabilidad ha cobrado importancia debido a que hace mas de 40 años su evolución implicaba un proceso complementario empírico, lo que ocasionaba que el tiempo entre la preparación del medicamento y su lanzamiento al mercado fuera muy extenso y privaba al público de un producto clínicamente útil, además de que incrementaba los costos, tanto para el fabricante como para el paciente. De esta manera, se fue haciendo cada vez más evidente la necesidad de encontrar métodos para evaluar anticipadamente la estabilidad del medicamento y de tener un método científico con el que se pudieran predecir las condiciones óptimas para su máxima estabilidad. Un medicamento en malas condiciones ya sea por que no tiene la dosis rotulada y el medico no logra el efecto deseado o por que sus características organolépticas no son las optimas y el mismo paciente las rechaza, no es una buena promoción para el producto. Es preciso que se realicen controles de la estabilidad de la forma farmacéutica tal cual sale a la venta¹⁸.



Hay una razón legal que exige que todos los medicamentos cumplan con las condiciones de identidad, efectividad, potencia, pureza e inocuidad durante el periodo en que se encuentran en el mercado y hasta el momento de ser usados, esta razón esta establecida en la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, ESTABILIDAD DE FÁRMACOS Y MEDICAMENTOS (MODIFICA A LA NOM-073-SSA1-1993, ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS, PUBLICADA EL 3 DE AGOSTO DE 1996). Actualmente, cada país posee una legislación referente a la estabilidad de los medicamentos, la cual generalmente se encuentra regulada por las agencias gubernamentales asociadas a la industria farmacéutica y se encargan de establecer los requerimientos mínimos que deben considerarse en los estudios de estabilidad. Sin embargo existen diferencias entre los estudios de estabilidad que se realizan en uno u otro país, lo que origina conflictos en la importación y exportación de medicamentos. Para solucionar este problema, en noviembre de 1992, en Bruselas Bélgica, se organizó la primera Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) de los requerimientos técnicos sobre estudios de estabilidad de fármacos y medicamentos, en las que participaron la Unión Europea, la FDA de los Estados Unidos y la Koseisho japonesa. Ahí se mostró que la armonización incrementa el control sobre las regulaciones farmacéuticas¹⁸.

- **Objetivo de los estudios de estabilidad**

El objetivo de los estudios de estabilidad es proporcionar evidencia de cómo la calidad de un fármaco o medicamento varía con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales. Los estudios de estabilidad permiten establecer las condiciones de almacenamiento, periodos de re-análisis y periodo de caducidad¹⁹.



- **Factores que influyen en la estabilidad**

Las causas que condicionan la estabilidad de un medicamento son de dos tipos: por una parte esta la labilidad propia del principio activo y de los excipientes y por otra parte están todos los factores externos, como la temperatura, humedad, y luz que inducen o aceleran las reacciones que afectan la calidad del medicamento.

Como se mencionó, dentro de los factores ambientales se encuentra la luz, este factor es muy importante, ya que los medicamentos fotosensibles deben tener un estudio a profundidad para elegir el material de empaque más adecuado y esto implica elevar el costo por producto. La temperatura es otro factor de importancia ya que los medicamentos a menudo son expuestos a variaciones de temperatura, ya sea por su transporte o por las condiciones de almacenamiento, además este factor es base de la estabilidad debido a que muchas reacciones dependen de él. Es necesario fijar que la interacción del medicamento con el material de empaque también puede influir en la estabilidad, esto se debe a la gran cantidad de sustancias libres que pudiera tener el envase y por consecuencia pueden actuar como catalizadores o reactivos²⁰.



- **Definiciones**

Calidad de un fármaco o de un medicamento. Cumplimiento de las especificaciones establecidas que garantizan la identidad, pureza, potencia y cualquier otra propiedad química, física o biológica que asegure su aptitud de uso.

Condiciones de almacenamiento. Las que se indican en la etiqueta del medicamento.

Envase primario. Elementos del sistema contenedor-cierre que están en contacto con el fármaco o el medicamento.

Especificación de estabilidad. Requerimientos físicos, químicos, biológicos o microbiológicos que un fármaco o medicamento debe cumplir a lo largo de su vida útil.

Estabilidad. Es la capacidad de un fármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil.

Estudio de estudio de estabilidad. Los estudios de estabilidad comprenden aquellas pruebas que se le realizan a un fármaco o un medicamento por un tiempo determinado, bajo la influencia de temperatura, humedad o luz en el envase que lo contiene.



Estudios de estabilidad acelerada. Estudios diseñados bajo condiciones exageradas de almacenamiento para incrementar la velocidad de degradación química, biológica o los cambios físicos de un fármaco o medicamento.

Fármaco. Toda sustancia natural, sintética o biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presente en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento.

Fármaco conocido. Al fármaco que ha sido utilizado previamente en el país.
Fecha de caducidad. Fecha que indica el fin del periodo de vida útil de un medicamento.

Forma farmacéutica. Es la mezcla de uno o más fármacos con o sin aditivos, que permita su administración.

Lote. A la cantidad de un fármaco o medicamento que se produce en un ciclo de fabricación y cuya característica esencial es su homogeneidad.

Lote piloto. Lote elaborado por un procedimiento representativo que simule al de producción.

Medicamento. Toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y que se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas.



Método analítico indicativo de estabilidad. Método analítico cuantitativo para un fármaco o medicamento capaz de distinguir cada ingrediente activo de otras sustancias y de sus productos de degradación.

Protocolo de estabilidad. Diseño del estudio relativo a pruebas y criterios de aceptación, características del lote, manejo de las muestras, condiciones del estudio, métodos analíticos y materiales de envase.

Sistema cierre-contenedor. Al conjunto de materiales de empaque que contienen y protegen a la forma farmacéutica. Incluyen tanto el envase primario como el secundario, si este último cumple la función de proporcionar protección adicional al producto.

Validación. Evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso en específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.

Vida útil. Es el intervalo de tiempo en el que un medicamento o fármaco permanece dentro de las especificaciones establecidas, bajo las condiciones de almacenamiento indicadas en la etiqueta, en el envase de comercialización¹⁹.



- **ICHQ5C Calidad para Productos Biotecnológicos**

Normatividad en los estudios de estabilidad para productos biotecnológicos/biológicos. (ICHQ5C Calidad para Productos Biotecnológicos: Estudios de Estabilidad para Productos Biotecnológicos/Biológicos).

Generalidades.

De acuerdo con la ICHQ5C los análisis de la actividad biológica deben de formar parte de los estudios de estabilidad de referencia. Los métodos fisicoquímicos, bioquímicos e inmunológicos para el análisis de la entidad molecular y la cuantificación de los productos de degradación deben formar parte de este estudio, siempre que la pureza y características moleculares del producto permitan el uso de estas metodologías.

Es necesario aplicar un estudio en las condiciones a las cuales se puedan afectar la potencia, pureza y calidad del producto, además éste, debe estar basado en un estudio a largo plazo, en tiempo real y en condiciones reales de estabilidad.

Entre los productos que comprenden estos estudios tenemos a: las citocinas (interferones, interleucinas, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral, eritropoyetinas, activador del plasminógeno, hormona de crecimiento), insulina, anticuerpos monoclonales y vacunas que consistan en proteínas o polipéptidos bien caracterizados.

La selecciones de lotes para llevar a cabo el estudio, deberán ser aquellos que se manufacturen en una escala representativa al de producción, se sugiere utilizar al menos 3 lotes²¹.



Los estudios deben llevarse a cabo en el mismo sistema contenedor cierre o representativo al propuesto para su almacenamiento y distribución, o en su defecto se deberá usar aquel envase utilizado en el proceso de manufactura. Se recomienda llevar a cabo la producción con diferentes lotes de diferentes proveedores.

La calidad sistema contenedor-cierre en los estudios clínicos y preclínicos debe ser representativos de los estudios de estudios de estabilidad.

Selección de la muestra.

Cuando un producto está distribuido en lotes que difieren en su llenado (p.ej. 1 mL, 2 mL), unidades (p.ej. 10 unidades, 20 unidades), o masa (p.ej. 1 mg, 2 mg) las muestras deben de integrarse en un programa de estabilidad basado un sistema factorial fraccionado o en diseño por categoría.

Perfil indicativo de estabilidad.

No existe un ensayo o parámetro particular indicativo de estabilidad para realizar un perfil de estabilidad que caracterice un producto biotecnológico/biológico. Como consecuencia de esto, el fabricante debe proponer un perfil indicativo de estabilidad que asegure que los cambios en la identidad, pureza y potencia de un producto puedan ser detectados.

Para que lo anterior pueda ser aplicado, se debe de contar con métodos validados que incluyan un perfil indicativo de estabilidad. Aunque no se tiene una guía, en la incluyan todas pruebas que deban aplicarse a dichos productos, que demuestren la estabilidad del mismo.



Protocolo.

El protocolo debe de incluir toda la información necesaria que demuestre que la estabilidad de un producto biotecnológico/biológico no se modifica, a través de la proposición de una fecha de caducidad, especificación e intervalos de análisis.

Potencia.

Cuando se intenta evaluar la estabilidad de un producto con actividad biológica definida y cuantificable, el análisis de la potencia debe ser parte fundamental del estudio.

Bajo este contexto, se entiende como potencia, a la habilidad específica o la habilidad de un producto de lograr su efecto. La determinación de la potencia se debe de determinar a través de un método cuantitativo confiable.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la potencia, deberán ser reportados en unidades de actividad biológica estandarizadas, que sean reconocidas nacional o internacionalmente. Cuando no existan tales referencias, el resultado del análisis debe ser reportado en base a unidades internas fundamentado en un material de referencia.

Pureza y caracterización molecular.

La pureza de un producto biotecnológico/biológico es difícil de determinar. Para ello se debe calcular por más de un método y el valor de esta es dependiente del método.

El uso de metodologías analíticas fisicoquímicas, bioquímicas e inmunológicas deben proveer una caracterización del fármaco o producto



final (p. ej. Tamaño de la molécula, carga, hidrofobicidad) así como una detección exacta de cambios en la degradación que pueden resultar de una desaminación, oxidación, sulfoxidación, agregación o fragmentación durante el almacenamiento.

Cuando ocurran cambios significativos en la calidad o cantidad, en la formación de productos de degradación detectados durante un estudio a largo plazo, o en un estudio acelerado, debe considerarse el potencial peligro para la salud que esto representa. Por lo anterior se requiere caracterizar y cuantificar el producto de degradación, así como establecer límites de aceptación que sean justificados.

Para las sustancias que no pueden caracterizarse satisfactoriamente o productos para los cuales no se pueda determinar su pureza a través de métodos analíticos de rutina. Se deben proponer y justificar procedimientos alternos de análisis.

Otras características del producto.

Siguiendo las características del producto, aunque no específicamente relacionadas con los productos biotecnológicos/biológicos, deben ser reportados y supervisados en el producto final en su contenedor.

Los aditivos (P. ej. Estabilizantes y conservadores) o excipientes pueden degradarse durante el periodo de caducidad. Si hay cualquier indicación durante los estudios preliminares de la estabilidad, que la reacción o la degradación de tales materiales al contrario afecta a la calidad del producto, estos artículos pueden necesitar ser supervisados durante programa de estabilidad.



Condiciones de almacenamiento

Temperatura

Las condiciones de almacenamiento en un estudio de estabilidad a un tiempo-real/ temperatura-real deben estar limitadas a las propuestas a la temperatura de almacenamiento.

Humedad.

Cuando pueda demostrarse que el sistema contenedor (y las condiciones de almacenamiento) asegura una suficiente protección en contra de una alta y baja humedad, el estudio de estabilidad a diferentes humedades relativas puede ser omitido.

Condiciones aceleradas y de estrés.

Se sugiere realizar estudios sobre el fármaco y producto terminado en condiciones aceleradas y de estrés. Los estudios en condiciones aceleradas pueden proporcionar datos útiles de soporte para establecer la fecha de caducidad, proporcionar información sobre los productos de estabilidad para el desarrollo de productos futuros (por ejemplo cambios en la formulación, ampliación), ayudar en la validación de métodos analíticos para el programa de estabilidad, o generar información que pueda ayudar a aclarar el perfil de la degradación de la sustancia medicamentosa o medicamento.

Los estudios bajo condiciones de estrés, pueden ser usados para determinar si una exposición accidental a otras condiciones distintas a las propuestas está deteriorando el producto además de determinar aquellos parámetros



específicos que pueden ser los mejores indicativos de estabilidad del producto. Los estudios de exposición de fármacos o producto terminado a condiciones extremas pueden ayudar a revelar patrones de degradación.

Sistema contenedor/cierre

Pueden ocurrir cambios en la calidad del producto por la interacción entre la formulación biotecnológica/biológica y el sistema contenedor/cierre. Los estudios de estabilidad deben incluir muestras, colocadas en posición invertida u horizontal (P. ej. En contacto con la tapa) así como en la posición con la tapa orientada hacia arriba, para determinar los efectos del contacto con la tapa en la calidad el producto.

Debe demostrarse que el sistema de cierre de un vial, con múltiples dosis es capaz de resistir la inserción repetida para retirar producto del contenedor, así como conservar toda su potencia, pureza, y calidad por un periodo máximo especificado en el instructivo para su uso en el contenedor.

Estabilidad después de la reconstitución o después del almacenamiento en congelación.

La estabilidad de un producto después de su reconstitución, debe demostrarse después de un periodo máximo de almacenamiento en su contenedor.



Frecuencia de Análisis.

El periodo de vida de anaquel de un producto biotecnológico/biológico puede variar de unos días hasta algunos años.

Es difícil elaborar una guía que sea uniforme para el estudio de estabilidad y la frecuencia de análisis que aplique a todos los tipos de productos biotecnológico/biológico.

Cuando el periodo de vida de anaquel propuesto sea de un año o menos, el estudio de estabilidad en tiempo-real debe conducirse mensualmente los primeros 3 meses, y después en intervalos de 3 meses.

Cada producto debe tener sus especificaciones dentro de límites establecidos para la seguridad, pureza, y potencia propuestos a través del periodo de vida de anaquel.

Etiquetado.

Debe especificar con precisión la temperatura de almacenamiento recomendada. Así como aquellos productos que no deben ser congelados y las condiciones apropiadas de luz/humedad deberán aparecer en el contenedor de acuerdo a los requerimientos de etiquetado nacional/regional



Citometría de flujo

- **Generalidades**

La citometría de flujo es, básicamente, un método analítico que permite la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de luz, inducidas por la iluminación apropiada de células o partículas microscópicas, a medida que desfilan, de una en una y arrastradas por un flujo portador, frente a un sistema de detección. En algunos sistemas, además, las células o partículas pueden ser separadas físicamente, de acuerdo a las propiedades exhibidas.

La citometría de flujo aprovecha el desarrollo de un amplio número de moléculas fluorescentes, que se unen específicamente a moléculas celulares, se acumulan selectivamente en compartimentos celulares o que modifican sus propiedades a través de reacciones bioquímicas específicas. De esta forma, la citometría de flujo permite detectar y cuantificar estructuras y funciones de células individuales o partículas biológicas aisladas, a elevada velocidad y siguiendo una aproximación multiparamétrica. Estas características la convierten en una técnica especialmente valiosa para caracterizar poblaciones celulares heterogéneas a través de un amplio rango de propiedades biológicas.

Debido al creciente número de parámetros biológicos analizables y al desarrollo de citómetros de costo accesible, dotados de sistemas informáticos, a la vez de uso relativamente sencillo y de alta capacidad operativa, la citometría de flujo tiene en la actualidad un amplio abanico de aplicaciones en muchos campos básicos y clínicos, donde se requiera identificar células o partículas biológicas, caracterizar sus propiedades y respuestas funcionales y, en algunos casos, separarlas físicamente²².



Componentes de un citómetro de flujo

Los componentes básicos de un citómetro de flujo, que con mayor o menor complejidad técnica, se encuentran en la mayoría de los instrumentos actuales son:

a) *Sistema hidráulico*: Rodea la suspensión celular en flujo, con una vaina externa, formada por un fluido libre de partículas, que mueve la muestra, a velocidad constante y controlada, a través de la zona de detección ("cámara de flujo"), donde las células o partículas son expuestas, una a una, al haz iluminador.

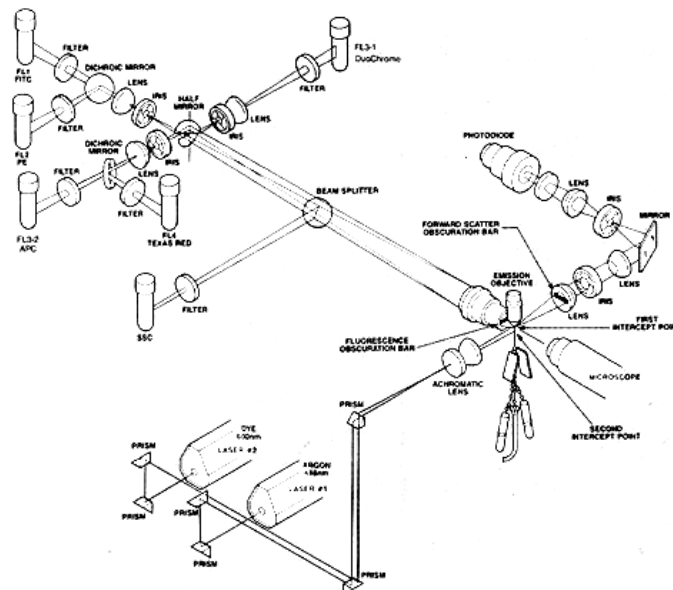
b) *Sistema de iluminación*: Produce un haz de luz que ilumina la muestra. La mayor parte de los citómetros utilizan luz láser, por ser coherente, monocromática, polarizada, estrecha, estable y de intensidad conocida, aunque hay sistemas que disponen de lámparas de mercurio.

c) *Sistema óptico*: Enfoca la iluminación de las partículas de muestra, detecta la luz dispersada por ellas y selecciona la fluorescencia emitida, a medida que las partículas atraviesan el haz luminoso.

d) *Sistema electrónico*: Proporciona una iluminación de intensidad constante, detecta y amplifica la respuesta de las partículas en forma de pulso analógico, transforma las señales en forma digital y controla el proceso de separación celular ("Cell Sorting").

e) *Sistema de adquisición y análisis de datos*: En la mayor parte de los citómetros modernos, es compatible con ordenadores personales y sistemas operativos comunes (plataformas MS-DOS, Windows y Macintosh). Permite la

adquisición multiparamétrica de datos y el análisis en tiempo real y en modo de lista (matrices de datos no correlacionados), así como el análisis restringido a subpoblaciones seleccionadas ("acotamiento"). Los datos se presentan en forma de histogramas monoparamétricos o representaciones biparamétricas de la distribución, junto con información estadística de las distribuciones. Existen diferentes programas comerciales de apoyo, utilizables en ordenadores independientes y, recientemente, se dispone de interesantes programas de dominio público recuperables en Internet²³.



Esquema de un citómetro de flujo con dos láseres y capacidad de separación, FACStar PLUS (Becton-Dickinson)



- **Características del análisis por citometría de flujo**

En sentido estricto, cualquier citómetro de flujo mide exclusivamente propiedades ópticas, es decir, luz emitida por fluorocromos o dispersada por las partículas en flujo. La conexión entre las propiedades biológicas de interés y los parámetros ópticos detectables se establece (Tabla 5) con el uso de marcadores fluorescentes adecuados, como los que aparecen clasificados, de forma amplia, en la Tabla 5. Se puede obtener información extensiva acerca de las propiedades ópticas y biológicas de un elevado número de fluorocromos en los catálogos y publicaciones de las compañías que los fabrican.

Tabla 5. Tipos de marcadores fluorescentes usados en citometría de flujo

1. Moléculas con reactividad química
2. Moléculas con especificidad estructural
3. Indicadores y quelantes fluorescentes
4. Substratos de enzimas
5. Macromoléculas y polímeros fluorescentes

La correcta aplicación de los marcadores fluorescentes permite detectar y cuantificar sitios estructurales o seguir funciones dinámicas en las células. Sin embargo, algunas funciones o estructuras de interés biológico pueden ser estudiadas sin necesidad de incorporar marcadores fluorescentes exógenos,

puesto que se pueden relacionar con la presencia de moléculas fluorescentes endógenas o con interacciones físicas específicas entre las células y la luz.

De acuerdo con las aplicaciones específicas de los fluorocromos y las propiedades de autofluorescencia, se pueden clasificar los parámetros biológicos analizables por la mayor parte de los citómetros de flujo como se muestra en la Tabla 6.

Los parámetros indicados en la Tabla 6 pueden ser estudiados a través de otros métodos analíticos, incluso utilizando los mismos marcadores fluorescentes (p.ej., espectrofluorimetría, microscopía confocal, etc.). Sin embargo, las características técnicas especiales de la citometría permiten obtener un grado de información sobre estos parámetros que es, probablemente, único entre las técnicas actuales de análisis biológico, como se muestra en la Tabla 7²⁴.

Tabla 6. Parámetros biológicos analizables en citometría

Estructuras que no requieren marcadores exógenos <ul style="list-style-type: none">• Volumen celular• Textura celular• Pigmentos fluorescentes	Funciones que no requieren marcadores exógenos <ul style="list-style-type: none">• Estado redox• Viabilidad celular
Estructuras que requieren marcadores exógenos <ul style="list-style-type: none">• Macromoléculas• Metabolitos de bajo peso• Regiones específicas en macromoléculas• Orgánulos subcelulares	Funciones que requieren marcadores exógenos <ul style="list-style-type: none">• Viabilidad• Integridad de la membrana plasmática• Transporte• Potenciales de membrana• Movimientos iónicos

Tabla 7. Información generada en el análisis por citometría de flujo

1. Intensidad de expresión de parámetros en una población celular.
 2. Heterogeneidad de expresión de parámetros dentro de una población celular.
 3. Relación entre parámetros en una población celular.
 4. Relación de parámetros en células individuales.
 5. Evolución de parámetros dinámicos.
 6. Correlación con parámetros determinados con otras técnicas tras separación celular.
-

- **Áreas de aplicación de la citometría de flujo**

El desarrollo tecnológico (óptica, electrónica, anticuerpos, fluorocromos) que ha acompañado a la citometría de flujo desde su aparición como técnica accesible en los años setenta, ha supuesto una reducción en la complejidad de los instrumentos y una gran expansión en su número y en el rango de aplicaciones, tanto básicas como clínicas. Así, en disciplinas como la inmunología, hematología y oncología, en las que la citometría de flujo se aplica fundamentalmente a la rutina clínica, han aumentado notablemente los aspectos de investigación básica. Por otra parte, las aplicaciones desarrolladas en el laboratorio básico, especialmente en biología molecular y fisiología celular, se han adaptado a estudios clínicos y biotecnológicos.



También hay que destacar el interesante desarrollo de la citometría de flujo en el estudio de microorganismos, en aplicaciones biotecnológicas, ecológicas y clínicas. El desarrollo tecnológico ha permitido aumentar la resolución y la sensibilidad de los citómetros de flujo haciendo posible su utilización para el estudio de partículas de pequeño tamaño y microorganismos.

Dentro de la Microbiología, la aplicación que ha tenido mayor aceptación es la de la detección de microorganismos en distintos medios, ya sean provenientes de alimentos o de pacientes. En estudios específicos a determinados microorganismos, sin embargo, el desarrollo de aplicaciones ha llegado a ser tan amplio como en mamíferos. Se puede estudiar el ciclo celular en levaduras y en bacterias, el estado metabólico, la presencia o ausencia de determinados enzimas, la viabilidad de los cultivos, la cantidad total de proteínas, la cantidad total de ácidos nucleicos, la expresión de determinados genes, la respuesta antes determinados agentes antimicrobianos, etc.

Dentro del campo de la alimentación la CDF ha sido utilizada, principalmente, en el estudio del efecto de los alimentos en el ser humano, ya sea, por su efecto inmunomodulador, anticancerígeno o, por el contrario, por la posible toxicidad que producen. Además, la CDF se utiliza en el campo de la biotecnología alimentaria y en los estudios de calidad de los alimentos. En este último aspecto donde la CDF puede tener un gran desarrollo, detectando la presencia de microorganismos en los alimentos. La utilización de anticuerpos monoclonales y de tinciones específicas de microorganismos puede ayudar a la rápida detección del contaminante²⁴.



Ensayos de inmunoabsorbancia

En estas técnicas se utilizan las enzimas como marcadores inmunoquímicos de los complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). El hecho de que una pequeña cantidad de enzima pueda catalizar una gran cantidad de sustrato permite amplificar la reacción Ag-Ac de tal manera que es posible detectar cantidades ínfimas de Ag o Ac en las muestras estudiadas. Por ello rivalizan con los métodos RIA (radioinmunoanálisis), ya que además de su gran sensibilidad tiene menores riesgos en el manejo de los reactivos y un tiempo de conservación de los mismos más prolongado.

Fundamentalmente existen dos tipos de enzimoanálisis (EIA) como también se les conoce, el homogéneo, que consiste en un análisis sencillo y rápido que permite la automatización, donde el complejo Ag-Ac modula la actividad enzimática y se pueden medir sin la necesidad de separar los componentes marcados enzimáticamente de los no marcados. El heterogéneo presenta mayor sensibilidad, para medir la actividad enzimática es necesario un paso previo de separación de los componentes marcados, que puede ser por precipitación o por la utilización de un Ag o Ac fijado a una fase sólida. Este último método de análisis es uno de los más usados y recibe el nombre genérico de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Es una técnica que permite detectar tanto Ag como Ac y consiste en una enzima conjugada a un Ac que reacciona con el sustrato adecuado produciendo color²⁵.



En ambos casos, la enzima utilizada debe cumplir con los requisitos mínimos: Debe estar altamente purificada y obtenerse de una forma económica. Debe poseer una actividad específica asociada, no debe estar presente en los líquidos biológicos en cantidades suficientes como para interferir en la reacción.

- **Ensayos de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)**

Las características de mayor importancia del comportamiento de los anticuerpos son la especificidad, cantidad, isotipo o clase y afinidad. La especificidad determina la capacidad del anticuerpo para distinguir entre el inmunógeno y otros antígenos, la cantidad de anticuerpo se puede medir de formas muy variadas. La composición isotópica de una respuesta de anticuerpo también determina las funciones biológicas que estos anticuerpos pueden efectuar y los sitios en los cuales se encontrará anticuerpo. Por último la fuerza de unión del anticuerpo a su antígeno en términos de unión a sitio de unión a antígeno único, a un antígeno monovalente, se llama afinidad (la fuerza de unión total de una molécula con más de un sitio de unión se conoce como avidéz). La fuerza de unión es importante, puesto que mientras más alta es la afinidad del anticuerpo por su antígeno menos anticuerpo se requiere para eliminar el antígeno, dado que los anticuerpos con afinidad más alta se unirán a concentraciones más bajas de antígeno²⁶.

Las moléculas de anticuerpo son muy específicas para su antígeno correspondiente; tienen la capacidad para detectar una molécula de un antígeno proteínico entre más de 10^8 moléculas similares. Esto hace a los anticuerpos tan fáciles de aislar y estudiar, como inestimables como sondas de procesos biológicos.



Con procedimientos químicos estándar habría una gran dificultad para distinguir entre dos proteínas estrechamente relacionadas. El valor de los anticuerpos como sondas moleculares ha estimulado el desarrollo de muchas técnicas sensibles y muy específicas para medir su presencia, medir su especificidad y afinidad para diversos antígenos y averiguar sus capacidades funcionales. En muchas técnicas estándar usadas en biología se aprovecha la especificidad y estabilidad de la unión antígeno-anticuerpo.

ELISA es un análisis de unión directa a anticuerpo (o antígeno), para este método se necesita una preparación pura de un anticuerpo o antígeno conocido o de ambos, con el fin de estandarizar la valoración. En ELISA una enzima se enlaza químicamente al anticuerpo. El componente no marcado, que en este caso sería el antígeno, se fija en un soporte sólido, por ejemplo, pozos en una placa de plástico, que absorberán cierta cantidad de cualquier proteína. Se permite que el anticuerpo marcado se una al antígeno no marcado, en condiciones en las cuales se bloquea la absorción inespecífica y cualquier anticuerpo y otras proteínas no unidas se eliminan por medio de lavados, la unión se detecta mediante una reacción que convierte un sustrato incoloro en un producto de reacción teñido. El cambio de color puede interpretarse directamente en la charola de reacción, lo que hace fácil la recolección de datos y también evita los peligros que plantea la radioactividad que se presenta en RIA. Esto hace de ELISA el método preferido para casi todos los análisis de unión directa²⁷.

Existen múltiples variantes de la técnica ELISA, que permiten la detección cualitativa o cuantitativa de antígeno o anticuerpo, de manera alternativa se realiza una curva estándar con base en concentraciones conocidas de anticuerpo o antígeno a partir de la cual es posible determinar la concentración desconocida de una muestra.



- **ELISA indirecta**

En esta variante puede detectarse o determinarse anticuerpos de un suero o alguna otra muestra que contenga el anticuerpo primario (AC_1), se añade a un pozo de microtítulo recubierto con antígeno. Después de eliminar por lavado cualquier AC_1 libre, la presencia de anticuerpo unido a antígeno se detecta mediante la adición de un anticuerpo antiespecie AC_2 secundario conjugado con una enzima, que se une al anticuerpo primario. A continuación se elimina por lavado cualquier AC_2 libre y se añade un sustrato para la enzima. La cantidad de producto de la reacción de color que se forma se mide con lectores espectrofotométricos de placa especializados, que pueden medir la absorción de la totalidad de los pozos de una placa de 96, en segundos²⁸.

- **ELISA competitiva**

En esta variante es posible cuantificar antígenos. En esta técnica se incubaba primero el anticuerpo en solución con una muestra que contiene el antígeno. Después la mezcla se añade a un pozo de microtítulo recubierto con antígeno. Cuanto más antígeno se encuentra en la muestra menos anticuerpo libre está disponible para unirse al pozo recubierto con antígeno. La adición de un anticuerpo secundario Ab_2 específico para cada isotipo del anticuerpo primario conjugado con una enzima puede utilizarse para determinar la cantidad de anticuerpo primario unido al pozo como un ELISA indirecto. Sin embargo, la prueba competitiva cuanto más alta es la concentración de antígeno en la muestra original tanto más baja es la absorción²⁹.



- **ELISA de sándwich**

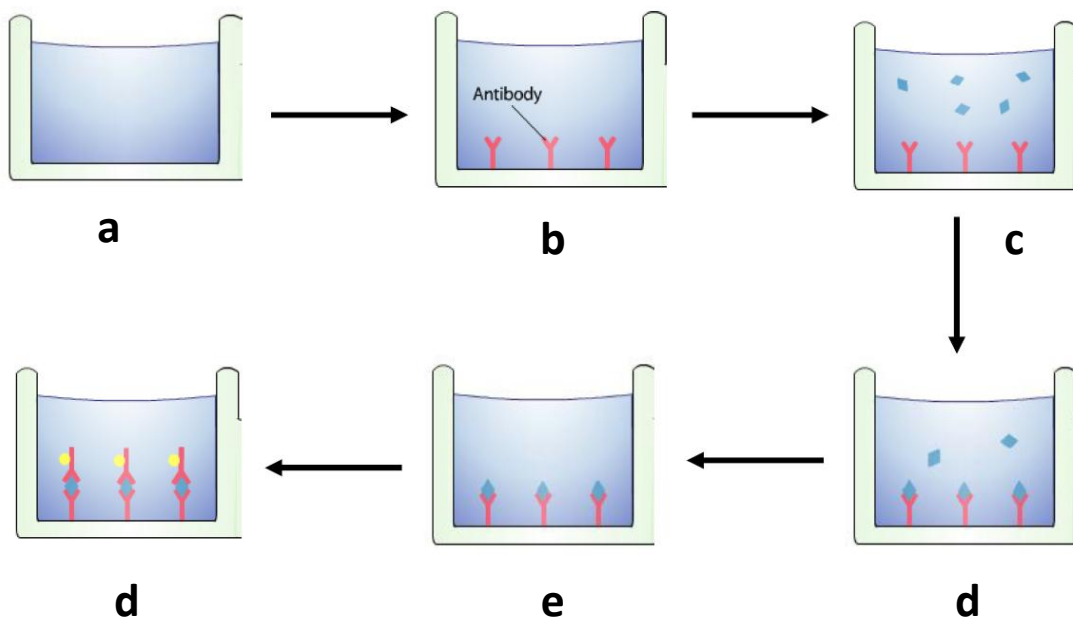
En esta variante es posible detectar o cuantificar un antígeno, es ideal para detectar productos secretados como citocinas. En esta técnica el anticuerpo se inmoviliza en un pozo de microtítulo, contenido en una placa de microtitulación (placas de plástico pequeñas, taradas para maximizar la unión a proteínas, que contienen 96 pozos con un volumen de 200 μ L), se añade una muestra que contiene antígeno y se deja reaccionar con el anticuerpo inmovilizado. Después se lava el pozo y se agrega un segundo anticuerpo específico para un epitopo distinto del antígeno se incuba para permitir la unión al otro sitio del antígeno. Se procede a otro lavado para eliminar anticuerpo libre y se añade un sustrato cromogénico y se mide el color producido por la reacción. La intensidad es directamente proporcional a la concentración del antígeno presente en la muestra problema³⁰.

Las enzimas comunes empleadas en la etapa de la detección son la peroxidasa de rabano picante y la fosfatasa alcalina; estas enzimas se pueden unir de manera covalente al anticuerpo sin afectar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo o bien, sin inhibir la actividad de la enzima. Una gran variedad de cromóforos se pueden incubar con los sustratos de estas enzimas para generar productos de color susceptibles de cuantificación mediante espectrofotómetros para placas de microtitulación.

Debido a que el último paso del ensayo es enzimático, estas pruebas tienen la ventaja de ser muy sensibles. Aunado a lo anterior, para mejorar aún más la sensibilidad, se pueden usar, algunos pasos adicionales, como puede ser la adición de anticuerpos secundarios marcados con la vitamina biotina. En este caso los pozos se incuban con avidina marcada enzimáticamente, la

cual se une a biotina con una afinidad y especificidad sumamente altas. Los ensayos inmunológicos mejorados con biotina/avidina permiten la detección de antígenos en cantidades extremadamente pequeñas³¹.

Figura 2. Diagrama del ELISA de sándwich



- a) Pozo de placa para ELISA, b) Fijación del anticuerpo de captura, c) Colocación del antígeno, d) Unión del antígeno con el anticuerpo, e) Eliminación del exceso de antígeno, f) Colocación del anticuerpo de lectura.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte en mujeres mayores de 25 años de edad a nivel mundial, por ello es importante el desarrollo de nuevos medicamentos que ayuden al tratamiento y cura de dicha enfermedad. El uso de citocinas, como la interleucina 2, ha resultado ser de gran utilidad en el tratamiento de distintos carcinomas; sin embargo, la citocina tiene un gran número de efectos adversos.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que 100UI/mL de IL-2 encapsulada en el sistema nanoacarreador (liposomas en una emulsión) tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación de células provenientes de cáncer cérvico uterino, además ha realizado estudios de caracterización del sistema, los cuales solo han contemplado parámetros de compatibilidad. En base a lo anterior, resulta importante realizar un estudio de estabilidad química y física que demuestre que la calidad de nuestro sistema no varía con respecto al tiempo bajo la influencia de factores ambientales como la humedad y la temperatura.



OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la estabilidad del sistema IL-2/liposomas, contenidos en un frasco vial de vidrio de boro silicato, cuando es sometido a una temperatura de 25°C y una humedad de 60%, durante un periodo de 6 meses, mediante la aplicación de la técnicas de inmunoensayo, citometría de flujo y microscopía electrónica.

Objetivos particulares

Implementar un inmunoensayo para la cuantificación de la IL-2 contenida en el sistema nanoacarreador.

Evaluar la estabilidad física del sistema nanoacarreador utilizando un análisis por citometría de flujo y microscopía electrónica.

Evaluar la estabilidad química del sistema nanoacarreador utilizando un inmunoensayo

Realizar el análisis de resultados de la estabilidad física por medio de un estudio estadístico de comparación mediante la implementación del programa Summit4.3



HIPÓTESIS

Estudios de preformulación y formulación han demostrado que el sistema farmacéutico constituido por liposomas con IL-2 es estable en un rango de temperatura en el que se encuentra los 25°C, por lo tanto esperamos que el sistema sea estable en su envase bajo las condiciones establecidas en un período de seis meses, evaluados mediante citometría de flujo, microscopía electrónica de transmisión e inmunoensayo.



PROTOCOLO DE ESTABILIDAD DE ACUERDO A LA NOM-073

Nombre del medicamento: Liposomas con IL-2

Forma farmacéutica: Emulsión

Presentación: Frasco vial con 2mL

Concentración: 100.99 UI/mL

Fabricante: Laboratorio de Oncología Celular, UMIEZ, FES Zaragoza, UNAM

Grado técnico de los aditivos

Principio activo: Interleucina 2 (IL-2), grado reactivo

Excipientes: Espermidin Colesterol, grado reactivo

Fosfatidil colina, grado reactivo

PBS (solución buffer de fosfatos), grado reactivo

LOTES

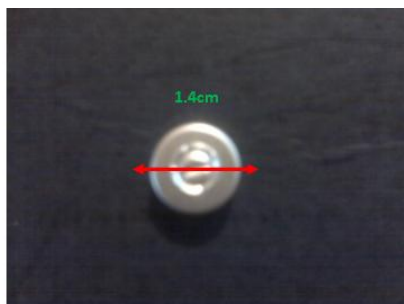
Tipo: Piloto

Tamaño: 40 frascos viales de 2mL

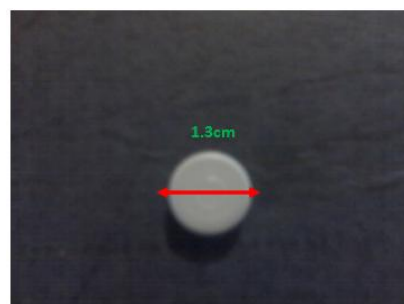
Numero de lotes: 1

Sistema Contenedor cierre

Frasco vial de vidrio tipo 1, con tapa de neopreno y casquillo de aluminio, con capacidad para 2 mL



Casquillo de aluminio



Tapa de neopreno



Frasco vial de vidrio

Tabla 8. Condiciones de estudio para un medicamento nuevo en condiciones de refrigeración

Tipo de estudio	Condiciones de almacenamiento	Periodo mínimo	Frecuencia de análisis
Estabilidad acelerada	$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ / $60\% \pm 5\%$ HR	6 Meses	0, 3, 6 meses

Tabla 9. Pruebas para el sistema nanoacarreador Liposomas/IL-2

		Prueba	Observaciones
Estabilidad a evaluar	Física	Citometría de flujo	Se realizara en todos los meses de evaluación
	Física	Microscopia electrónica de transmisión	Solo se utilizara como prueba confirmatoria
	Química	Inmunoensayo ELISA	Se realizara en todos los meses de evaluación

Tabla 10. Tiempos de muestreo

Condición	Muestreos						
	Basal	1	2	3	4	5	6
	Fechas de muestreo y análisis						
25°C±2/60 % HR±5%	15/09/11	12/10/11	9/11/11	7/12/11	4/01/12	1/02/12	29/02/12



Parámetros de prueba

- Por análisis de citometría de flujo

Tamaño FSC (*Forward Scatter*)

Complejidad SSC (*Side Scatter*)

Relación FSC (*Forward Scatter*) y SSC (*Side Scatter*)

- Por análisis de inmunoensayo

Concentración 100.99 UI/mL

Tabla 11. Especificaciones de estabilidad

		Prueba	Valor inicial	Variación permitida
Estabilidad a evaluar	Física	Citometría de flujo	10,000 eventos	No mayor al 5%
	Química	Inmunoensayo ELISA	100.99 UI/mL	No mayor al 5%



MATERIAL

Fabricación del sistema nanoacarreador con IL-2

1. Balanza analítica marca Ohaus
2. Tubos de ensayo 13x100 mm.
3. Sonificador.
4. Tanque de nitrógeno filtrado.
5. Tubos cónicos de 1,5 mL. Marca Ependorf.
6. Jeringa de vidrio de 100 μ L. Marca Hamilton
7. Micropipetas de 10, 200 y 1000 μ L. Marca Ependorf.
8. Pipeta dosificadora. Marca Ependorf.
9. Ultracentrífuga. Marca Solbat
10. Cronómetro.
11. Campana de flujo laminar. Marca Veco
12. Cloroformo.
13. Interleucina 2
14. Lípidos.
15. Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (Phosphate Buffered Saline PBS).
16. Frasco vial de borosilicato de 2 mL de capacidad con tapón de neopreno y casquillo de aluminio.
17. Engargoladora.
18. Inmunoplasmas. Marca RD
19. Micropipetas de 2, 20, 200 y 1000 μ L. Marca Ependorf.
20. Lector de ELISA. Marca Bio-Tek



21. Tubos cónicos de 15 mL y de 2 mL de polipropileno.
22. Micropipeta dosificadora. Marca Ependorf.
23. Puntas para micropipetas de 2, 20, 200 y 1000 μ L. Marca Ependorf.
24. Reservorios.
25. Agitador de tubos.
26. Minicentrífuga para tubos cónicos de 2 mL.
27. Potenciómetro. Marca Conductronic
28. Tubos para Citómetro
29. Citómetro de flujo. Marca BD

Soluciones requeridas para técnica de ELISA

1. Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (Phosphate Buffered Saline PBS)
2. Buffer de lavado- 0,05% Tween 20 en PBS, pH 7,4.
3. Diluyente- 0,1% de albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin, BSA), 0,05% de Tween 20 en solución buffer tri-salina pH 7,3 (20 mM de base Trizma, 150 mM de NaCl).
4. Solución sustrato- Mezcla 1:1 de agente colorante A (H_2O_2) y agente colorante B (tetrametilbenzidina) (R&D Systems, Catalog # DY999).
5. Solución Stop- Ácido Sulfúrico 1 M.
6. Solución tritón al 5%.
7. Polivinil pirrolidona al 1% 0,05% Tween 20 en PBS, pH 7,4.



MÉTODO

Fabricación de liposomas

1. Se pesaron con exactitud 30 mmoles de espermidin colesterol y se colocaron en un tubo de ensayo de 13x100 mm, previamente esterilizado.
2. Se agregaron 30 mmoles de fosfatidilcolina al tubo de ensayo.
3. Con ayuda de una micropipeta de 1000 μ L, se agregó 3 mL de cloroformo a la mezcla de fosfolípidos. Se continuó agitando hasta que se observó una solución.
4. Se separó la solución en tres tubos de ensayo 13x100 mm estériles.
5. Se secó el disolvente mediante una corriente de nitrógeno.
6. A cada tubo se le agregó interleucina-2 a 100 UI/mL diluida en un máximo de 700 microlitros de PBS (solución buffer de fosfatos).
7. Se sónico 3 ciclos de 5 segundos, con descanso de 10 segundos entre cada ciclo.
8. En un tubo de ensayo de 13x100 mm, se añadió la solución de fosfolípidos contenida en cada tubo.
9. Se sónico nuevamente, 3 ciclos de 5 segundos, con descanso de 10 segundos entre cada ciclo.
10. Se dividió la solución en dos tubos cónicos de 1,5 mL, llenándolos a su máxima capacidad con PBS (solución buffer de fosfatos).
11. Se ultracentrifugo a 40 000 RPM durante 40 minutos.
12. Se quitó el sobrenadante y se resuspendió en PBS (solución buffer de fosfatos).
13. Se agregó solución de PBS (solución buffer de fosfatos) cbp 40 mL y se homogenizó.



14. Posteriormente se acondicionó con ayuda de una pipeta dosificadora en ampolletas de vidrio de borosilicato de 2,0 mL, previamente esterilizadas. y se sellaron las ampolletas.

Acondicionamiento de estufa de estabilidad

1. Se acondicionó la cámara de humedad saturando el medio con NaCl hasta alcanzar $60\% \pm 5\%$ de humedad relativa con ayuda de termohigrómetro. Se dejó que la humedad se estabilizara.
2. Se monitoreó la temperatura y la humedad relativa continuamente y en cada tiempo de muestreo.

Muestreo y análisis por medio de citometría de flujo

1. Se colocó un termómetro y un higrómetro dentro de la cámara de humedad y se dejó que se estabilizaran. Posteriormente se tomaron las lecturas.
2. Se extrajeron tres muestras de liposomas (para realizar la prueba por triplicado), y se analizó visualmente el material de empaque.
3. Se extrajo el contenido del material de empaque y se colocó en tubos para citómetro.
4. Se acondicionó el citómetro como lo indica el manual de uso (Ver instrucciones de acondicionamiento)
5. Se programó el citómetro a 10 000 eventos
6. Se analizaron las muestras y se guardaron los polígonos con nombre clave, condición y fecha de trabajo
7. Se realizó el análisis estadístico mediante el programa Summit 4.3.



Acondicionamiento del citometro BD FACSDiVa

- 1.- Encender el instrumento principal, ver que los láseres estén apagados.
AVISO: No encender el láser hasta que haya activado la corriente. La ejecución del láser sin necesidad de activar la corriente puede degradar el rendimiento de la celda de flujo.

- 2.- Iniciar el ordenador, poner en marcha BD software FACSDiVa. Para iniciar el software, haga doble clic en el acceso de aplicaciones en el escritorio.

- 3.- Revisar los niveles de fluidos en el marco del instrumento; reponer los líquidos o el vacío de los residuos, si es necesario. Para mostrar el cuadro de instrumentos, haga clic en el botón del instrumento en la barra de herramientas del espacio de trabajo. Verificar los niveles de líquido en la parte inferior del marco.

- 4.- En el menú de instrumentos BD FACSDiVa, elija Fluidics de inicio, haga clic en aceptar en el mensaje. El procedimiento de inicio Fluidics elimina el agua de los tanques de DI pleno y las líneas de líquido y lo reemplaza con fluido del contenedor.

- 5.- Cuando el procedimiento “Fluidics” de inicio se haya completado, utilizar los controles del software para iniciar la secuencia.
 - Hacer clic en el botón de selección de área de la barra de herramientas para mostrar la “Breakoff” y las ventanas laterales “Stream”.
 - Hacer clic en el botón de corriente en la ventana de “Breakoff” a su vez en la secuencia.



6.- Comprobar la posición de funcionamiento en el aspirador de residuos e inspeccionar la imagen de la corriente en la ventana de "Breakoff". La corriente debe fluir suavemente de la boquilla en el centro del aspirador de residuos. Deben aparecer gotas y espacios uniformes. Si la corriente fluye, pero es inestable, abrir la celda de flujo por la puerta de acceso y comprobar si hay burbujas en la celda de flujo. Si se observan burbujas, apague la corriente, espere unos segundos, y encienda la corriente de nuevo.

7.- Encender el láser, esperar 30 minutos para calentar. Para activar el láser, presione el botón de potencia del láser correspondiente en el panel de poder.

8.- Elegir un experimento nuevo o uno ya existente.

Determinación de la morfología de los liposomas por microscopía electrónica de transmisión.

Se tomaron muestras de los viales en las fechas establecidas, posteriormente se tomaron alícuotas de 5 μ L de liposomas y se colocaron en rejillas de cobre con 200 mallas que estaban cubiertas con formvar, se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y después se eliminó el líquido por decantación con papel filtro.

Posteriormente las muestras se tiñeron con una solución acuosa de acetato de uranilo al 4% durante 5 minutos, se elimina el exceso de líquido y se deja secar durante 24 hr. Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión y se tomaron fotografías a 80K.



Interleucina expuesta y total

Por la naturaleza del sistema farmacéutico, la interleucina se puede encontrar en dos regiones del sistema, la primera es en la superficie del liposoma, esta IL-2 le proporciona más especificidad y una rugosidad que se ve reflejada en la complejidad del sistema. La segunda es la encapsulada, que se encuentra en el interior del liposoma, el compartimiento único en este caso. Por este motivo es necesario cuantificar la IL-2 expuesta y la IL-2 total que incluye la IL-2 expuesta y la IL-2 encapsulada.

Muestreo y análisis por medio de inmunoensayo

Cuantificación de IL-2 mediante técnica de ELISA.

Preparación de la placa para ELISA.

1. Transferir 100 μL /pozo de el anticuerpo de captura (diluir la concentración apropiadamente con PBS, usando intermedios) a una placa de ELISA. Sellar la placa e incubar a temperatura ambiente.
2. Aspirar cada pozo y lavar con Buffer de Lavado, repetir el proceso dos veces para un total de 3 lavados. Lavar llenando cada pozo con Buffer de Lavado (400 μL) usando un bote atomizador, pipeta multi-canal, dispensador múltiple o autolavador. Completar la eliminación del líquido en cada paso es esencial para un buen funcionamiento. Después del último lavado, remover cualquier remanente del Buffer de Lavado por aspiración o por inversión de la placa y secar con una toalla de papel limpia.
3. Bloquear la placa adicionando 300 μL de PBS que contenga 1% de BSA, 5% de sacarosa y 0,05% de NaN_3 en cada pozo. Incubar a temperatura ambiente por 1 hora mínimo.



4. Repetir la aspiración/lavado como en el paso 2. Las placas ahora están listas para la adición de la muestra. Alternativamente, el amortiguador de bloqueo se puede aspirar después del paso 3 y las placas pueden ser secadas al vacío. Cuando se encuentren cerrados con desecante, las placas pueden ser almacenadas a 4 ° - 8°C por lo menos 2 meses.

Procedimiento de valoración de IL-2 expuesta y encapsulada en el sistema nanoacarreador.

1. Las diluciones problema y estándares deben ser preparados en tubos de polipropileno. Adicionar 50 µL/pozo de la muestra o estándar en un diluyente apropiado. Mezclar golpeando suavemente el marco de la placa por un minuto. Cubrir con una tira adhesiva e incubar por 2 horas a temperatura ambiente. Para la cuantificación de la IL-2 total agregar a los pozos de las muestras 50 µL de tritón para deshacer los liposomas.
2. Repetir la aspiración/lavado como en el paso 2 para la Preparación de la Placa.
3. Adicionar 100 µL del anticuerpo-biotina de detección, diluir en un diluyente apropiado, en cada pozo. Cubrir con una tira adhesiva nueva e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
4. Repetir la aspiración/lavado como en el paso 2 para la Preparación de la Placa.
5. Adicionar 100 µL de estreptavidina HRP (R&D System, Catalog # DY998, diluir conforme las indicaciones en la etiqueta) en cada pozo. Cubrir la placa e incubar por 20 min a temperatura ambiente.
6. Repetir la aspiración/lavado como en el paso 2 para la Preparación de la Placa.
7. Adicionar 100 µL de Solución Sustrato en cada pozo. Incubar por 20-30 minutos a temperatura ambiente. Evitar colocar la placa a luz directa.



8. Adicionar 50 μL de Solución Stop en cada pozo. Golpear la placa suavemente para garantizar un mezclado completo.
9. Determinar la densidad óptica de cada pozo dentro de 30 minutos, usando un lector de microplacas a 450 nm. Si la corrección de la longitud de onda está disponible, establecerla a 540 nm o 570 nm. Si la corrección de la longitud de onda no está disponible, restar lecturas a 540 nm o 570 nm de la lectura a 450 nm. Esta resta será correcta para las imperfecciones ópticas de la placa. Lecturas realizadas directamente a 450 nm sin corrección puede ser muy exactas o menos exactas.



RESULTADOS

Los histogramas de la relación directa entre complejidad y tamaño presentan un polígono de referencia. El polígono uno (P1) contiene la mayoría de la población en pruebas basales. Este polígono ha sido utilizado para analizar las partículas a lo largo del desarrollo del sistema farmacéutico, con el objetivo de evaluar la producción. Por este motivo el polígono es la base de todos los análisis, incluyendo los basales de cada lote. Se debe resaltar que todas las poblaciones se analizaron bajo estos parámetros, la población de nuestra prueba basal no se encuentra en un 100% dentro del polígono, pero al realizar el análisis se tomó como 100% a la población que estuvo dentro del polígono, ya que dicha población tiene las características ideales del lote producido, a partir de esto, los análisis mensuales fueron evaluados puntualmente en sus características de tamaño y complejidad del lote producido y no de las características generales de producción con el fin de evitar externalidades que afecten los resultados.

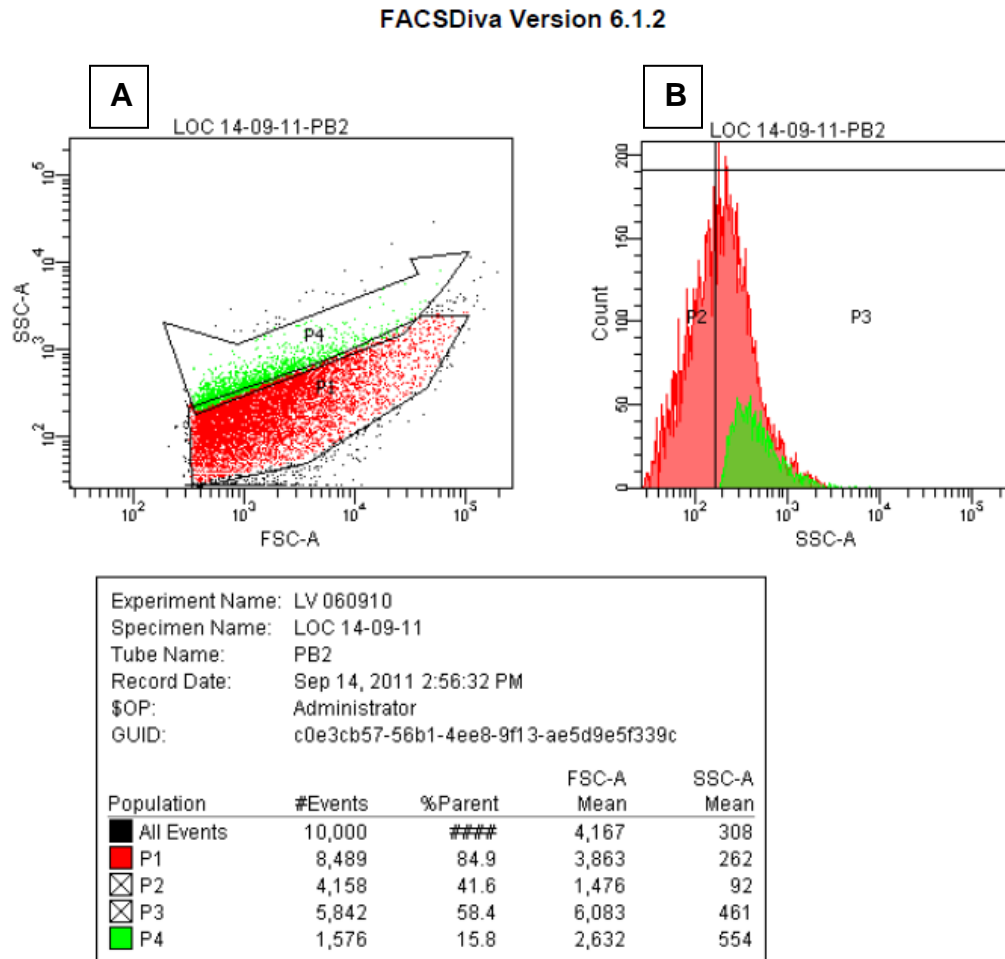


RESULTADOS

Citometria. Estabilidad física

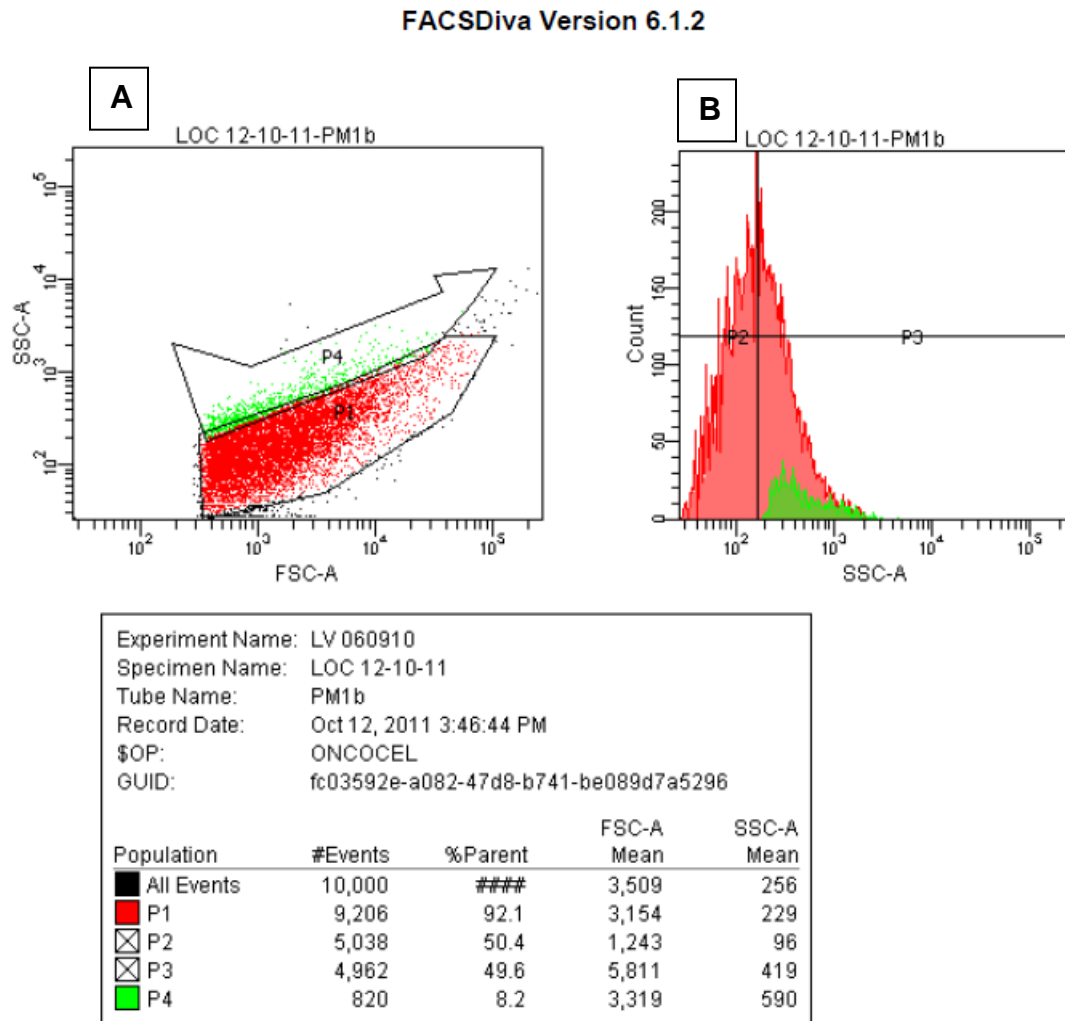
Histogramas, relación directa entre complejidad y tamaño según el polígono de referencia. Muestra basal y análisis mensual.

▪ **Figura 1. Prueba basal o tiempo cero**



La figura 1 nos muestra dos histogramas. El histograma A muestra la relación directa entre el tamaño y la complejidad de las partículas, la región P1 (color rojo), representa la población estándar del sistema, la región P4 (color verde) representa la desviación de la población típica de la producción. Con este histograma podemos observar que nuestra población total no son los 10,000 eventos, si no la población que esta dentro de la región P1. El histograma B, muestra una relación directa entre la complejidad y número de eventos además de sobreponer las 2 poblaciones antes mencionadas con el fin de observar su tendencia.

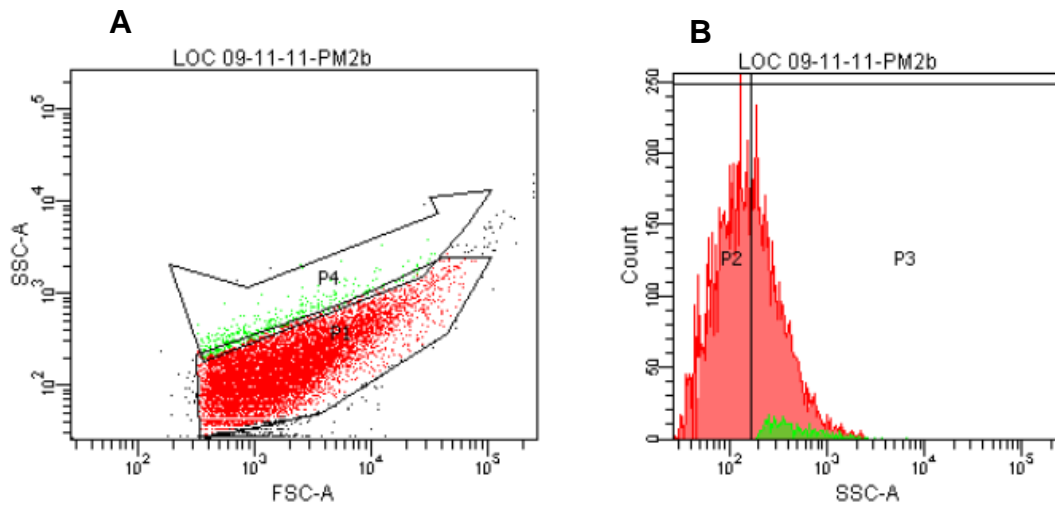
▪ **Figura 2. Prueba mes 1**



En el histograma A se observa una disminución de la población de la región P4 (población de la desviación de producción) y un aumento en la población de la región P1. En el histograma B se observa la misma tendencia. Esto hace notar pérdida de complejidad del sistema.

▪ **Figura 3. Prueba mes 2**

FACSDiva Version 6.1.2

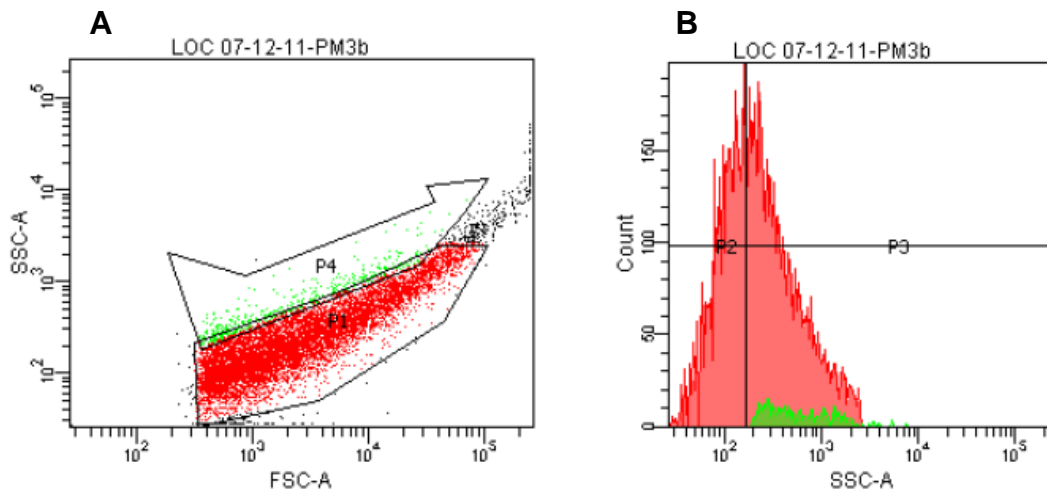


Experiment Name: LV 060910				
Specimen Name: LOC 09-11-11				
Tube Name: PM2b				
Record Date: Nov 9, 2011 2:45:35 PM				
\$OP: ONCOCEL				
GUID: 11d87b9f-1ac0-4757-b880-2456c4db5ada				
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean
■ All Events	10,000	####	3,868	239
■ P1	9,323	93.2	3,476	210
⊠ P2	5,682	56.8	1,400	93
⊠ P3	4,318	43.2	7,117	432
■ P4	392	3.9	3,250	586

En el histograma A, la tendencia hacia la disminución de la población de la región P4 continúa y se sigue reflejando en el histograma B. Además de observarse una concentración de los eventos en el cuadrante inferior izquierdo.

▪ **Figura 4. Prueba mes 3**

FACSDiva Version 6.1.2

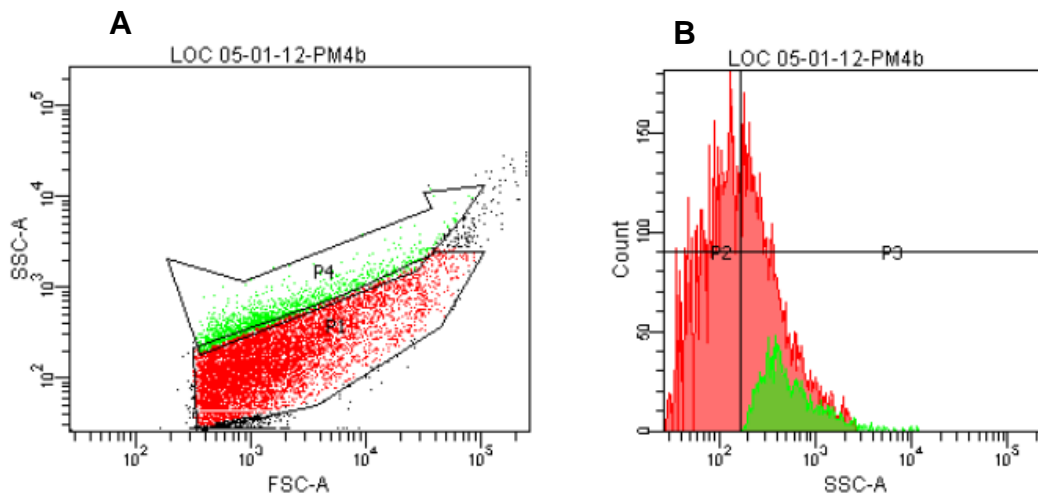


Experiment Name:	LV 060910			
Specimen Name:	LOC 07-12-11			
Tube Name:	PM3b			
Record Date:	Dec 7, 2011 1:01:52 PM			
\$OP:	ONCOCEL			
GUID:	9feca238-a41c-494c-89ba-9ff3354556b1			
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean
■ All Events	10,000	###	10,296	521
■ P1	9,408	94.1	6,912	344
▣ P2	3,961	39.6	1,164	102
▣ P3	6,039	60.4	16,286	797
■ P4	468	4.7	6,067	782

En el histograma A, se observa una nueva población que esta a fuera de la región P1 y P4, esta se ubica en le cuadrante superior derecho, lo que indica un aumento de tamaño y complejidad. Además se continúa con la disminución de la población en la región P4.

▪ **Figura 5. Prueba mes 4**

FACSDiva Version 6.1.2

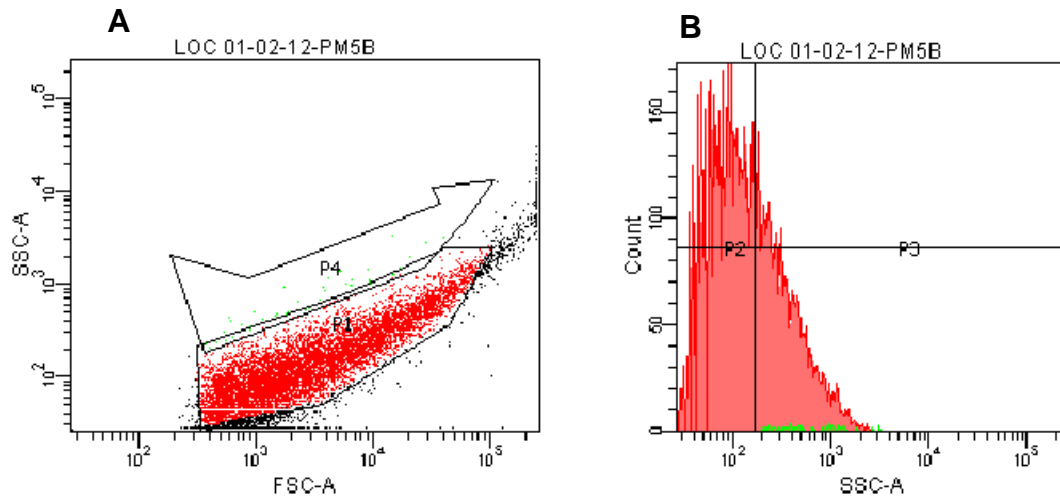


Experiment Name: LV 060910				
Specimen Name: LOC 05-01-12				
Tube Name: PM4b				
Record Date: Jan 5, 2012 1:13:00 PM				
\$OP: ONCOCEL				
GUID: 8c83a171-cf9b-495e-bd33-ddc502355512				
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean
■ All Events	10,000	###	5,377	380
■ P1	8,423	84.2	4,064	257
⊠ P2	5,068	50.7	1,143	83
⊠ P3	4,932	49.3	9,728	685
■ P4	1,333	13.3	4,974	742

En el histograma A se observan dos poblaciones fuera de las regiones P1 y P4, la primera esta ubicada en el cuadrante inferior izquierdo, la cual refleja una perdida total de complejidad, la segunda ubicada en el cuadrante superior derecho refleja un aumento del tamaño y la complejidad.

▪ **Figura 6. Prueba mes 5.**

FACSDiva Version 6.1.2



Experiment Name: LY 060910				
Specimen Name: LOC 01-02-12				
Tube Name: PM5B				
Record Date: Feb 1, 2012 12:33:26 PM				
§OP: ONCOCEL				
GUID: 26790d5c-4613-4f89-9973-257c23f2bd11				
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean
■ All Events	10,000	####	11,855	297
■ P1	8,323	83.2	7,843	210
⊠ P2	6,405	64.0	1,846	73
⊠ P3	3,595	35.9	29,688	696
■ P4	52	0.5	6,147	827

En el histograma A, se observa una polarización de las poblaciones, la población de la región P4 es mínima, mientras que las nuevas dos poblaciones (color negro) reflejan la aglutinación del lípido cuadrante superior derecho) y el desdoblamiento de los liposomas (cuadrante inferior izquierdo) observado también en el histograma B.



RESULTADOS

Los histogramas de la relación directa de tamaño FSC VS cantidad de liposomas (eventos) y complejidad (SSC) VS cantidad de liposomas (eventos), fueron creados con el programa Summit 4.3 y no contienen datos de producción de lotes anteriores. Estos histogramas solo representan la población evaluada. El programa tiene la capacidad de establecer donde se encuentra la mayoría de la población que cumple una característica específica, a esta área se le denomina R2, en nuestro caso tamaño (FSC) o complejidad (SSC). A partir de esto, todas las poblaciones que se analicen contarán con la misma cantidad de eventos evaluados dentro del histograma (R2). Este programa nos proporciona el comportamiento por separado de las características de nuestro sistema farmacéutico.



RESULTADOS

**Histogramas. Relación directa de tamaño FSC y cantidad de liposomas
(eventos)**

- **Figura 7. Prueba basal, histograma de relación directa entre tamaño y número de eventos.**

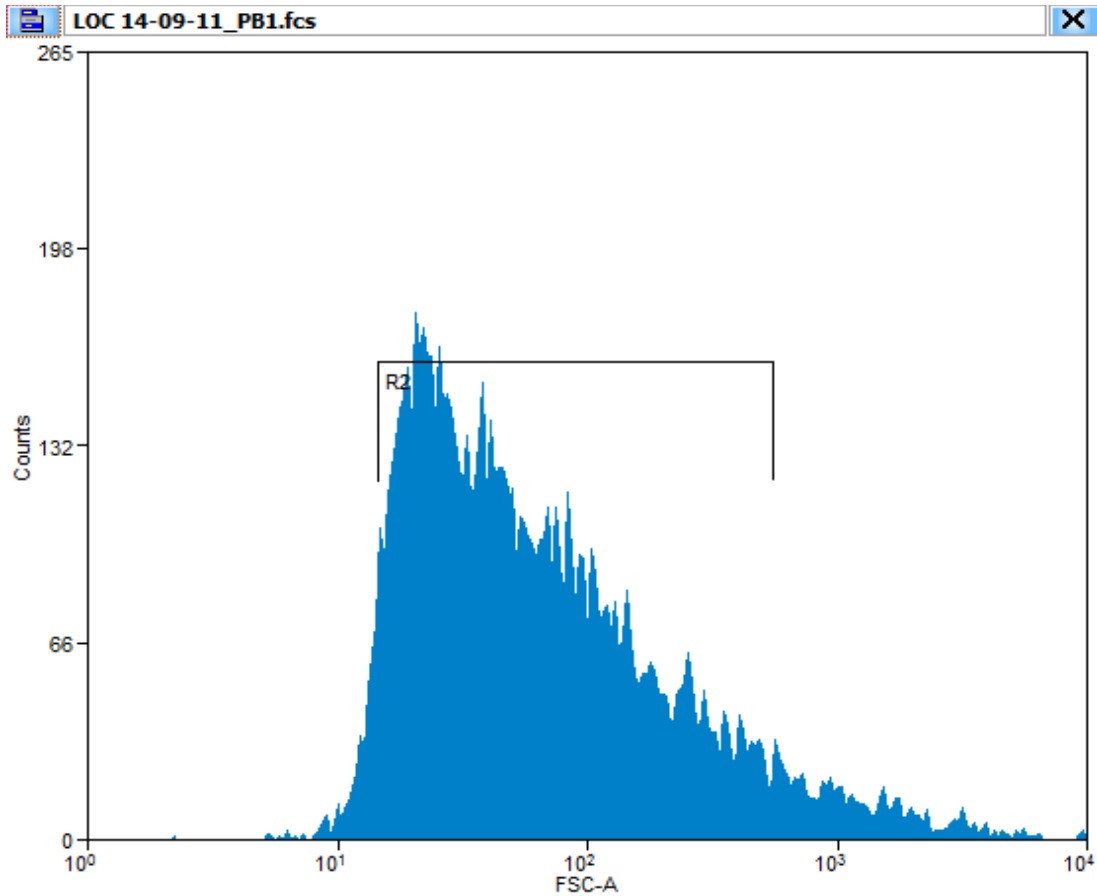


Tabla 12. Número de eventos y % de distribución de la prueba basal.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	9008	90.08	90.08
% Evaluado	9008	100%	100%

La figura 7, muestra la prueba basal con respecto al tamaño. La región analizada (R2) establece que de un total de 10,000 eventos 9,008 tienen características similares, por ello este valor es el 100% y la referencia para los próximos análisis.

- **Figura 8. Prueba mes 1, histograma de relación directa entre tamaño y número de eventos.**

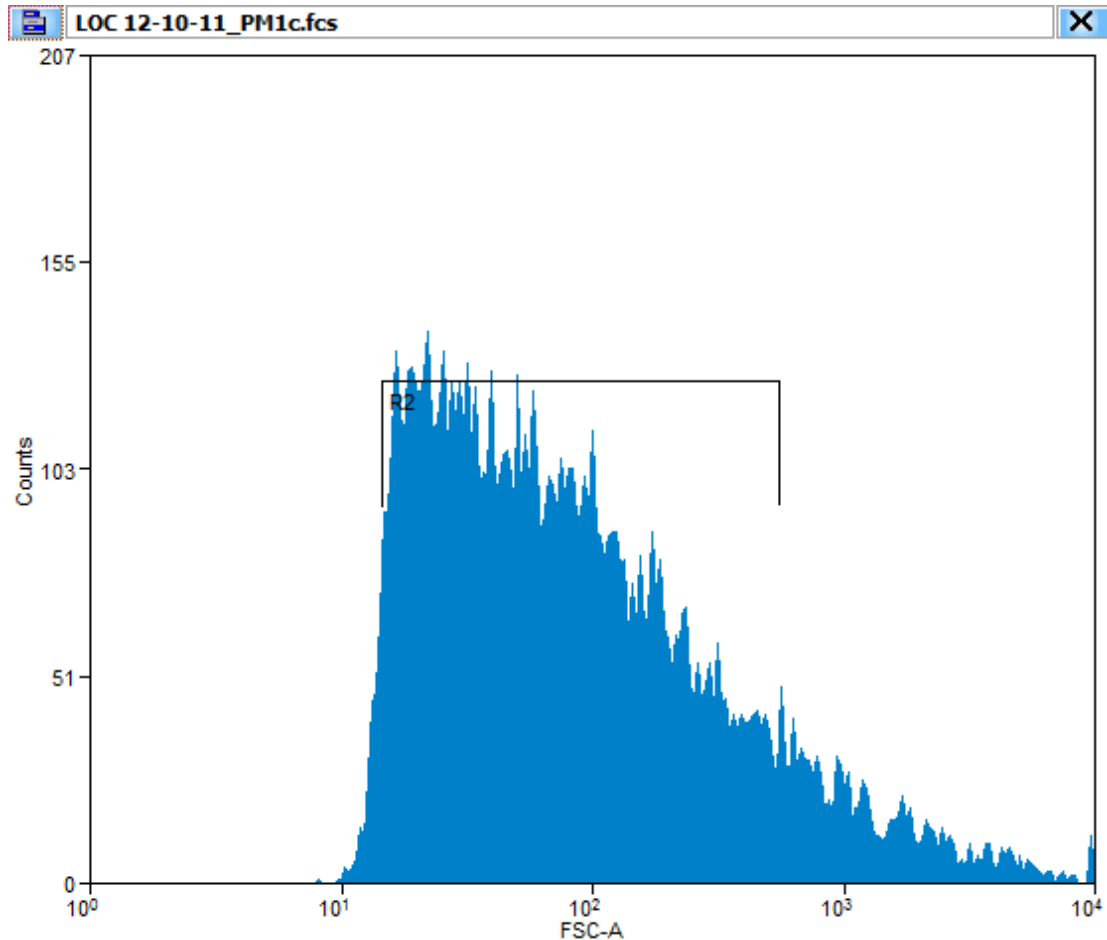


Tabla 13 Número de eventos y % de distribución de la prueba mes 1.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	8,747	87.47	87.47
% Evaluado	8,747	97.10	97.10

En el mes 1, el R2 proporciona el análisis donde se observan 8,747 eventos, los cuales representan el 97.10% de la población con respecto al valor basal. Existe una disminución del 2.90%.

- **Figura 9. Prueba mes 2, histograma de relación directa entre tamaño y número de eventos.**

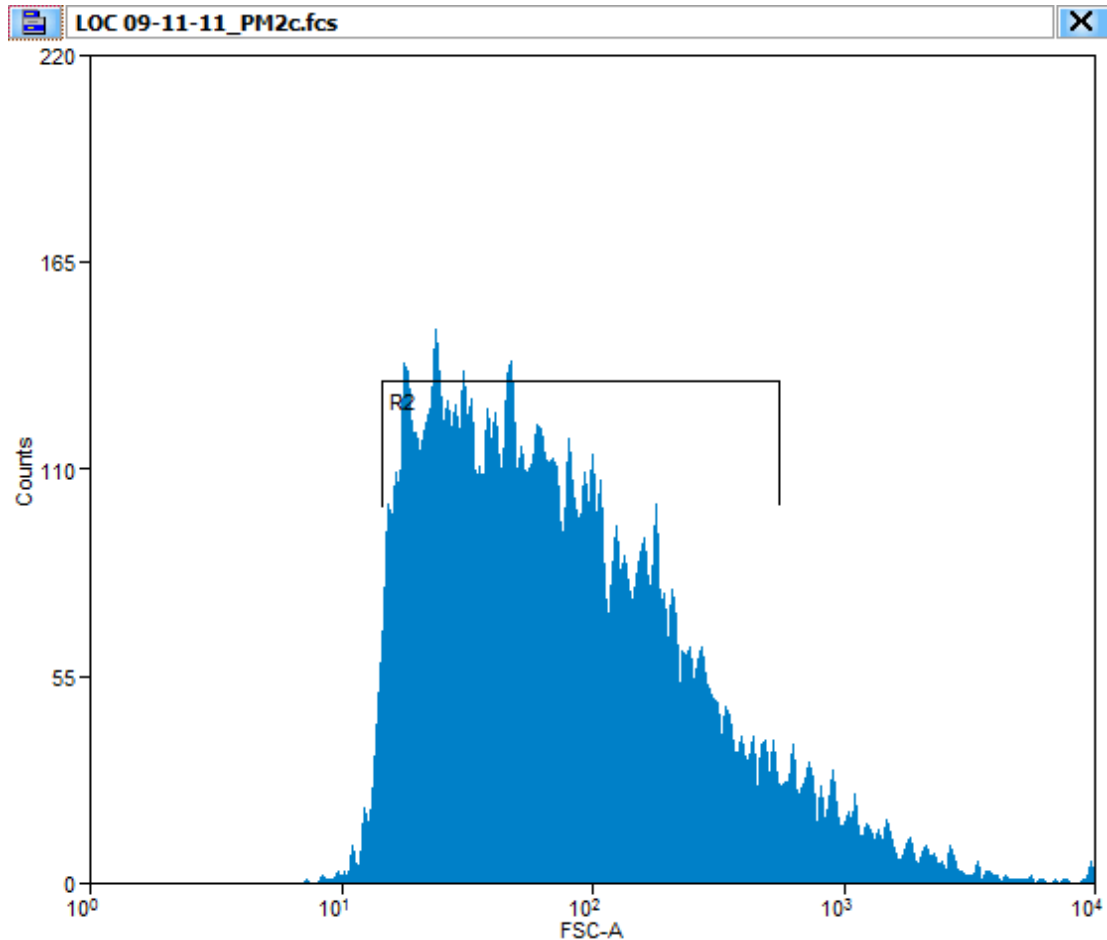


Tabla 14. Número de eventos y % de distribución de la prueba mes 2.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	9,122	91.22	91.22
% Evaluado	9,122	101.26	101.26

En el mes 2, el R2 proporciona el análisis donde se observan 9,122 eventos, los cuales representan el 101.26% de la población con respecto al valor basal. Existe un aumento de 1.26%.

- **Figura 10. Prueba mes 3, histograma de relación directa entre tamaño y número de eventos.**

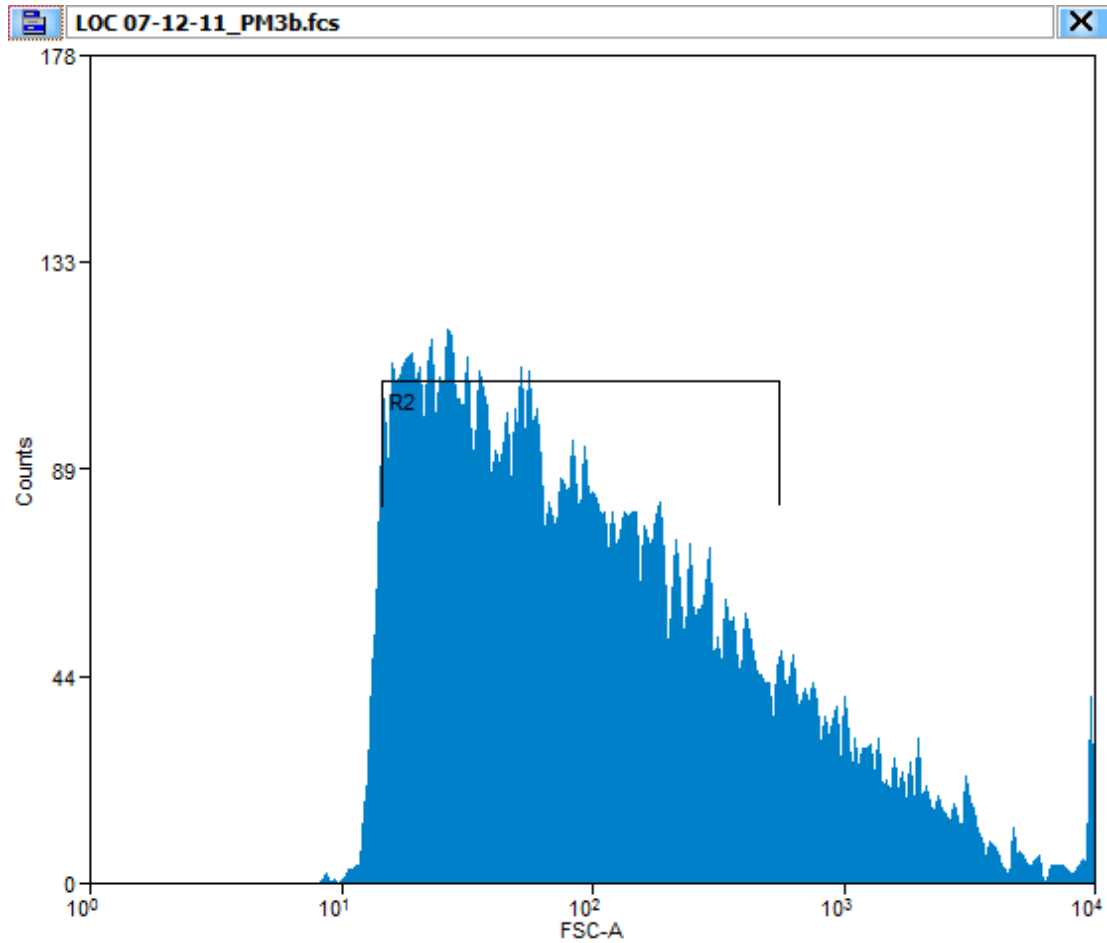


Tabla 15. Número de eventos y % de distribución de la prueba mes 3.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	8,306	83.06	83.06
% Evaluado	8,306	92.20	92.20

En el mes 3, el R2 proporciona el análisis donde se observan 8,306 eventos, los cuales representan el 92.20% de la población con respecto al valor basal. Existe una disminución del 7.80%.

- **Figura 11. Prueba mes 4, histograma de relación directa entre tamaño y número de eventos.**

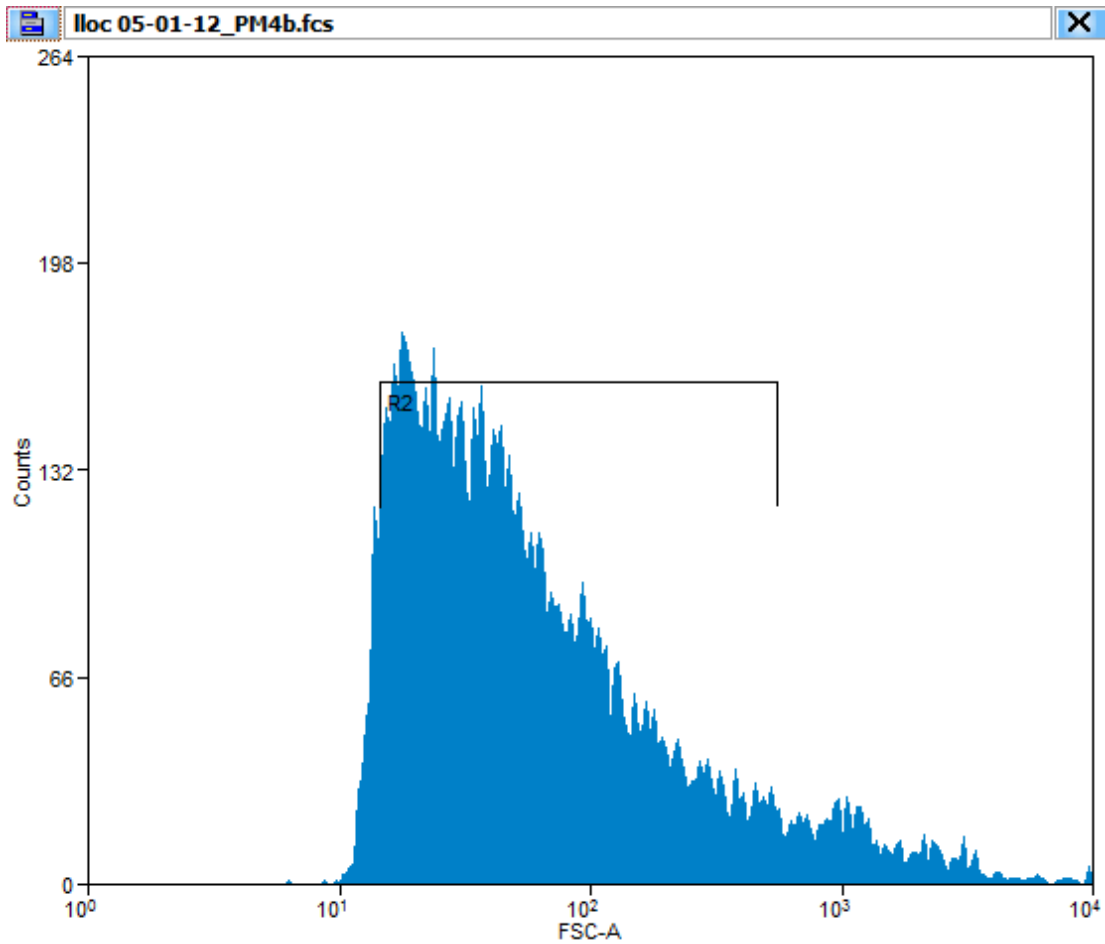


Tabla 16. Número de eventos y % de distribución de la prueba mes 4.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	8,886	88.86	88.86
% Evaluado	8,886	98.64	98.64

En el mes 4, el R2 proporciona el análisis donde se observan 8,886 eventos, los cuales representan el 98.64% de la población con respecto al valor basal. Existe una disminución del 1.46%.

- **Figura 12. Prueba mes 5, histograma de relación directa entre tamaño y número de eventos.**

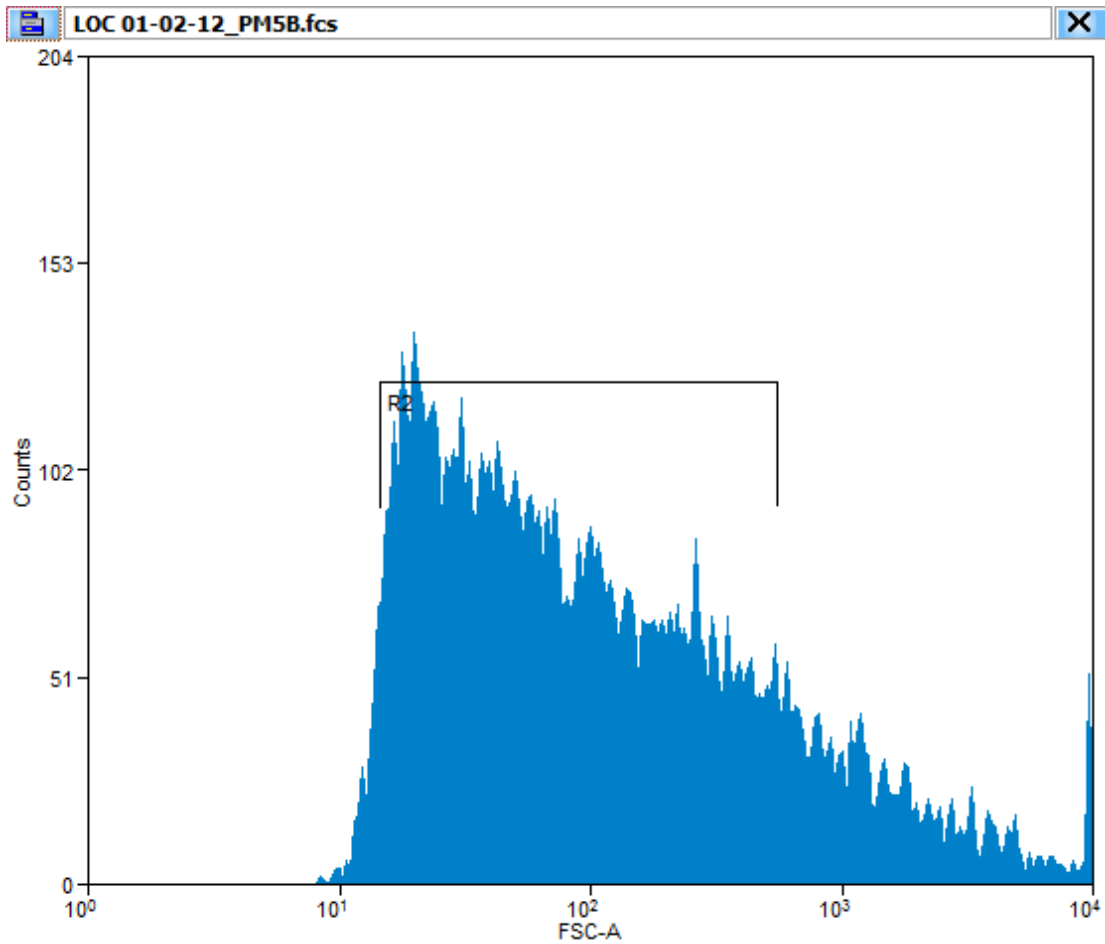


Tabla 17. Número de eventos y % de distribución de la prueba mes 5.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	8,548	85.48	85.48
% Evaluado	8,548	94,89	94,89

En el mes 5, el R2 proporciona el análisis donde se observan 8,548 eventos, los cuales representan el 94.89% de la población con respecto al valor basal. Existe una disminución del 5.11%.



RESULTADOS

Histogramas. Relación directa de complejidad SSC y cantidad de liposomas (eventos)

Figura 13. Prueba basal, histograma de relación directa entre complejidad y número de eventos.

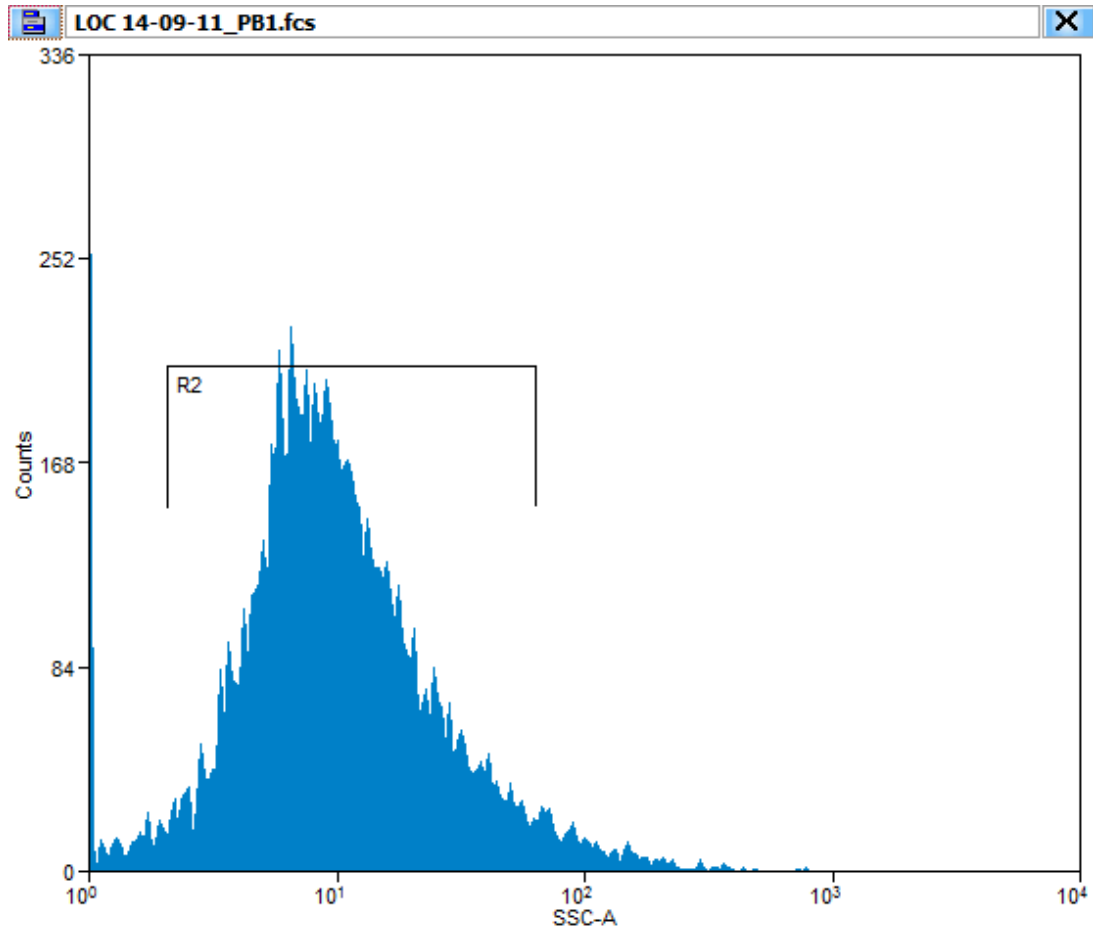


Tabla 18. Número de eventos y % de distribución de la prueba basal.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	9,003	90.03	90.03
% Evaluado	9,003	100	100

La figura 13 muestra la prueba basal con respecto a la complejidad. La región analizada (R2) establece que de un total de 10,000 eventos 9,003 tienen características similares, por ello este valor es el 100% y la referencia para los próximos análisis.

Figura 14. Prueba mes 1, histograma de relación directa entre complejidad y número de eventos.

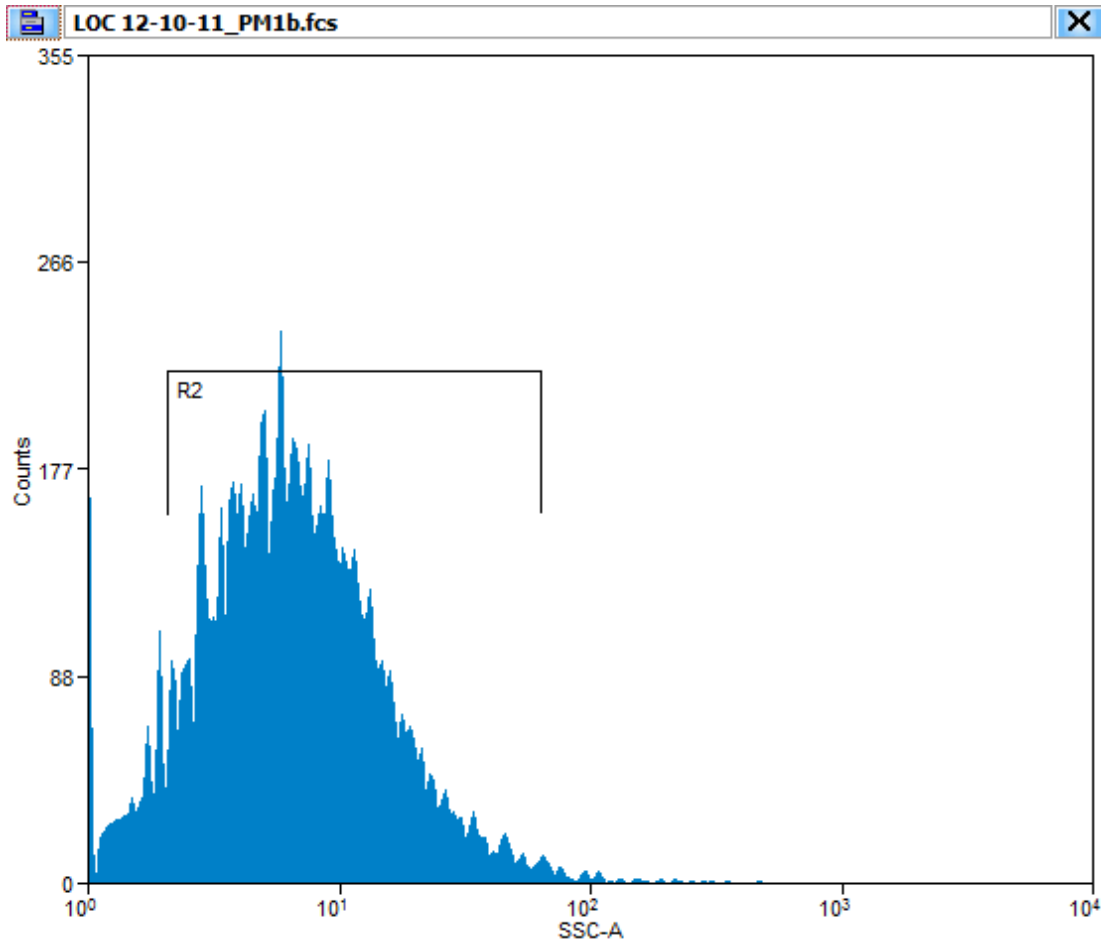


Tabla 19. Número de eventos y % de distribución de la prueba mes 1.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	8,947	89.47	89.47
% Evaluado	8,947	99.37	99.37

En el mes 1, el R2 proporciona el análisis donde se observan 8,947 eventos, los cuales representan el 99.37% de la población con respecto al valor basal. Existe una disminución del 0.63%.

Figura 15. Prueba mes 2, histograma de relación directa entre complejidad y número de eventos.

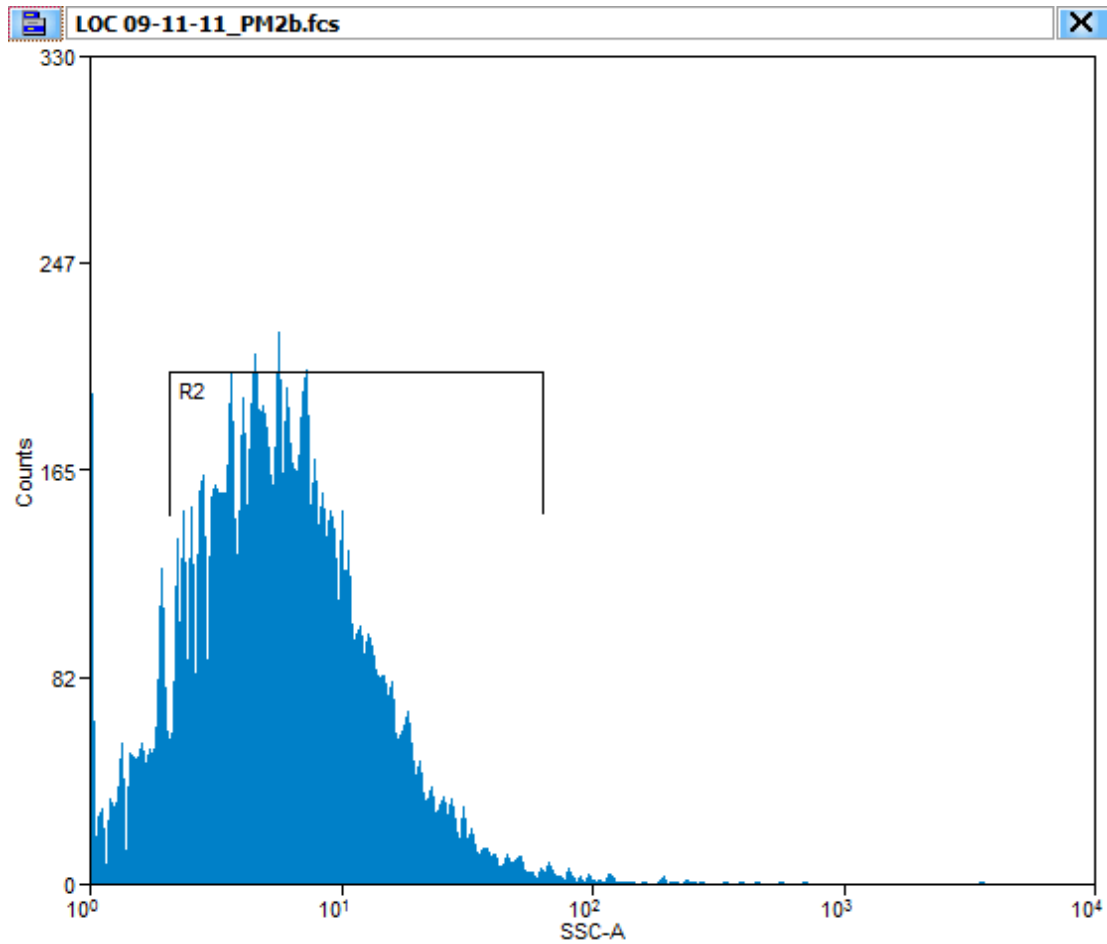


Tabla 20. Número de eventos y % de distribución de la prueba mes 2.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	8,941	89.41	89.41
% Evaluado	8,941	99.31	99.31

En el mes 2, el R2 proporciona el análisis donde se observan 8,941 eventos, los cuales representan el 99.31% de la población con respecto al valor basal. Existe una disminución del 0.69%.

Figura 16. Prueba mes 3, histograma de relación directa entre complejidad y número de eventos.

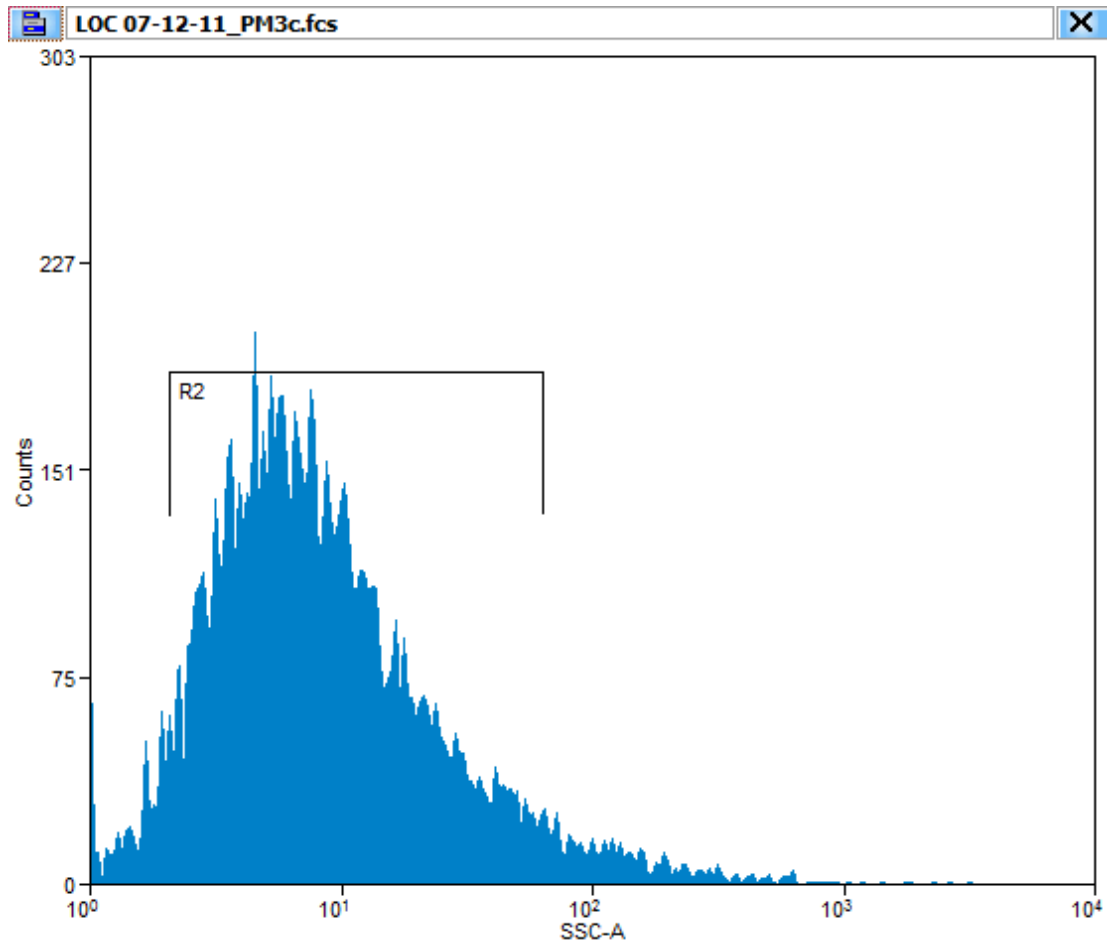


Tabla 21. Número de eventos y % de distribución de la prueba mes 3.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	8,941	89.41	89.41
% Evaluado	8,941	99.31	99.31

En el mes 3, el R2 proporciona el análisis donde se observan 8,941 eventos, los cuales representan el 99.31% de la población con respecto al valor basal. Existe una disminución del 0.69%.

Figura 17. Prueba mes 4, histograma de relación directa entre complejidad y número de eventos.

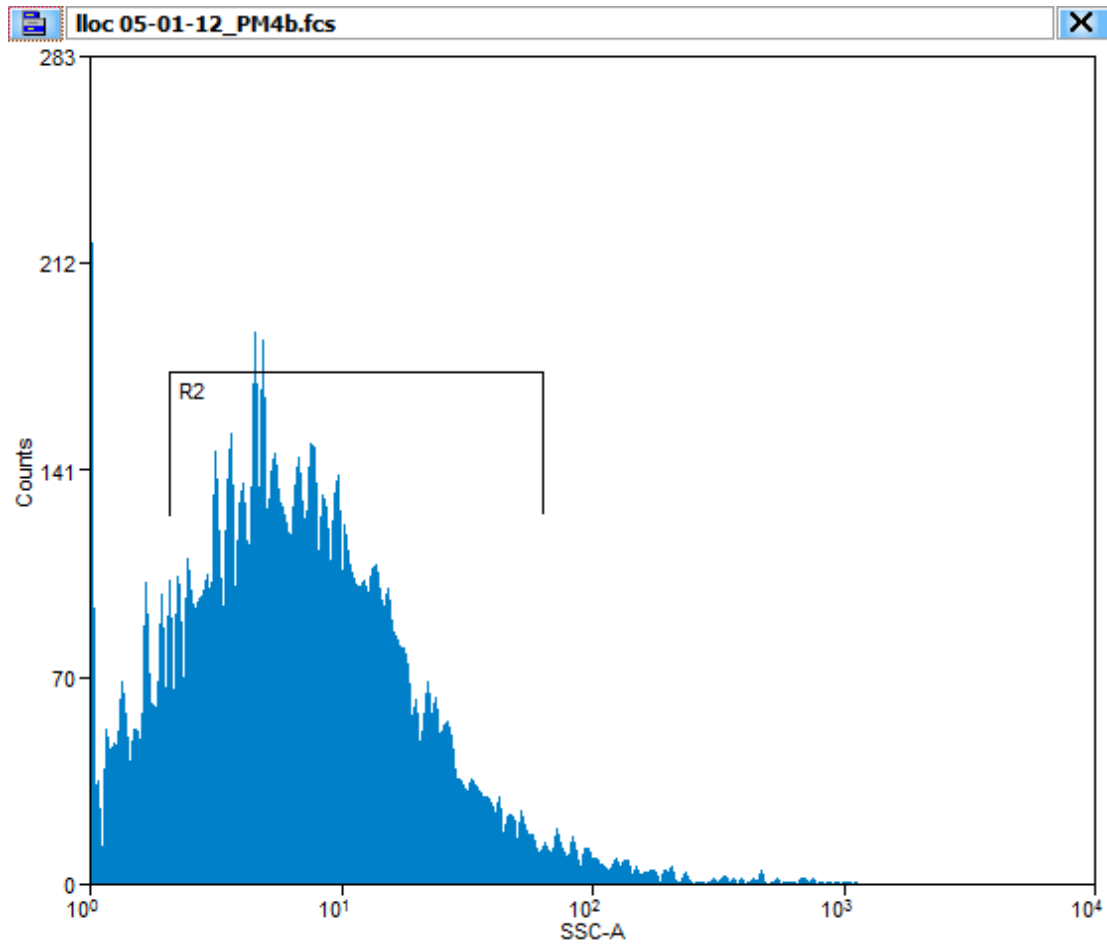


Tabla 22. Número de eventos y % de distribución de la prueba mes 4.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	8,222	82.22	82.22
% Evaluado	8,222	91.32	91.32

En el mes 4, el R2 proporciona el análisis donde se observan 8,222 eventos, los cuales representan el 91.32% de la población con respecto al valor basal. Existe una disminución del 8.68%.

- **Figura 18. Prueba mes 5, histograma de relación directa entre complejidad y número de eventos.**

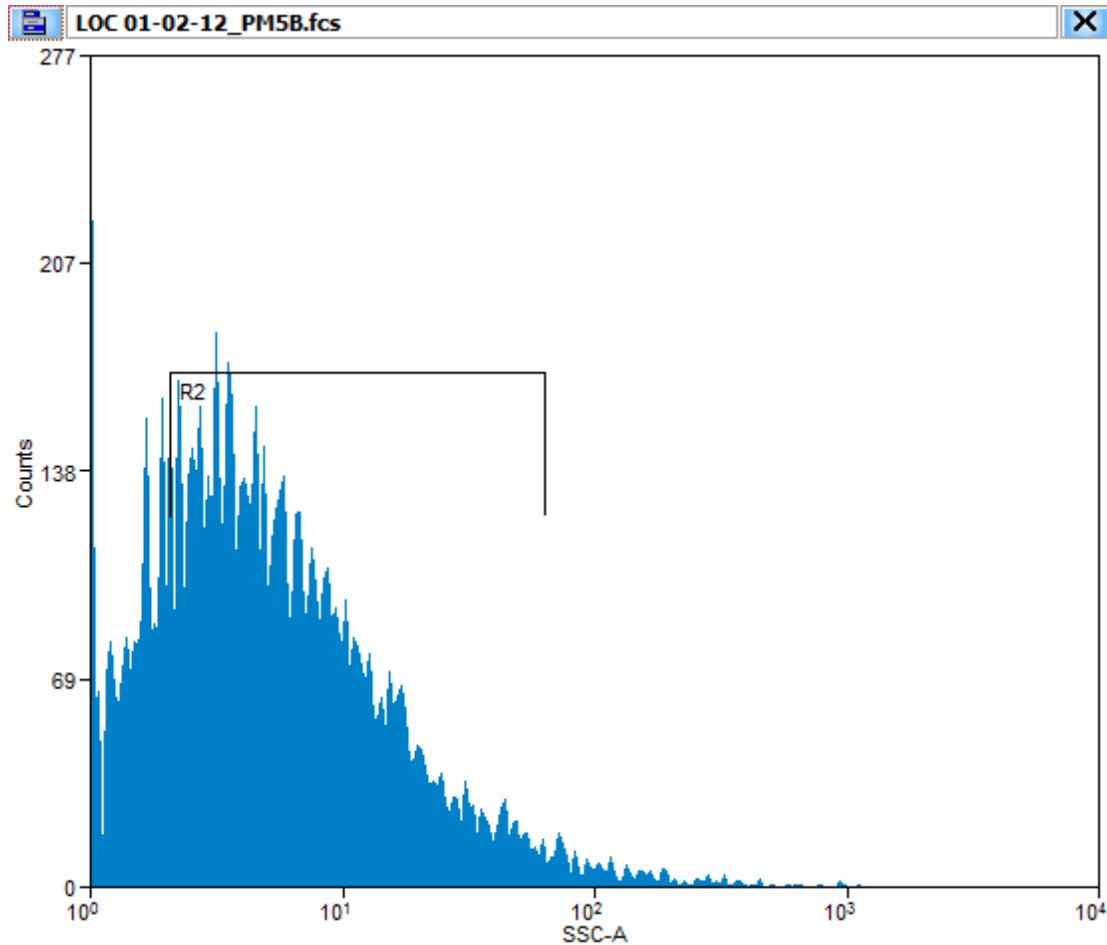


Tabla 23. Número de eventos y % de distribución de la prueba mes 5.

Región	Eventos	% Hist.	% Total
Total	10,000	100	100
R2	7,385	73.85	73.85
% Evaluado	7,385	82.02	82.02

En el mes 5, el R2 proporciona el análisis donde se observan 7,385 eventos, los cuales representan el 82.02% de la población con respecto al valor basal. Existe una disminución del 17.98%.



RESULTADOS

**Immunoensayo, ELISA. Estabilidad química.
Curva estándar para la cuantificación de interleucina**

Tabla 24. Lecturas de absorbancia

Concentración ng/mL	ABS 450 nm			ABS 570 nm		
	8	0,695	0,71	0,747	0,051	0,051
6	0,472	0,454	0,469	0,051	0,051	0,051
4	0,385	0,409	0,365	0,056	0,064	0,046
2	0,205	0,21	0,217	0,047	0,048	0,053
1	0,129	0,121	0,127	0,051	0,048	0,05
0	0,093	0,093	0,093	0,05	0,049	0,049

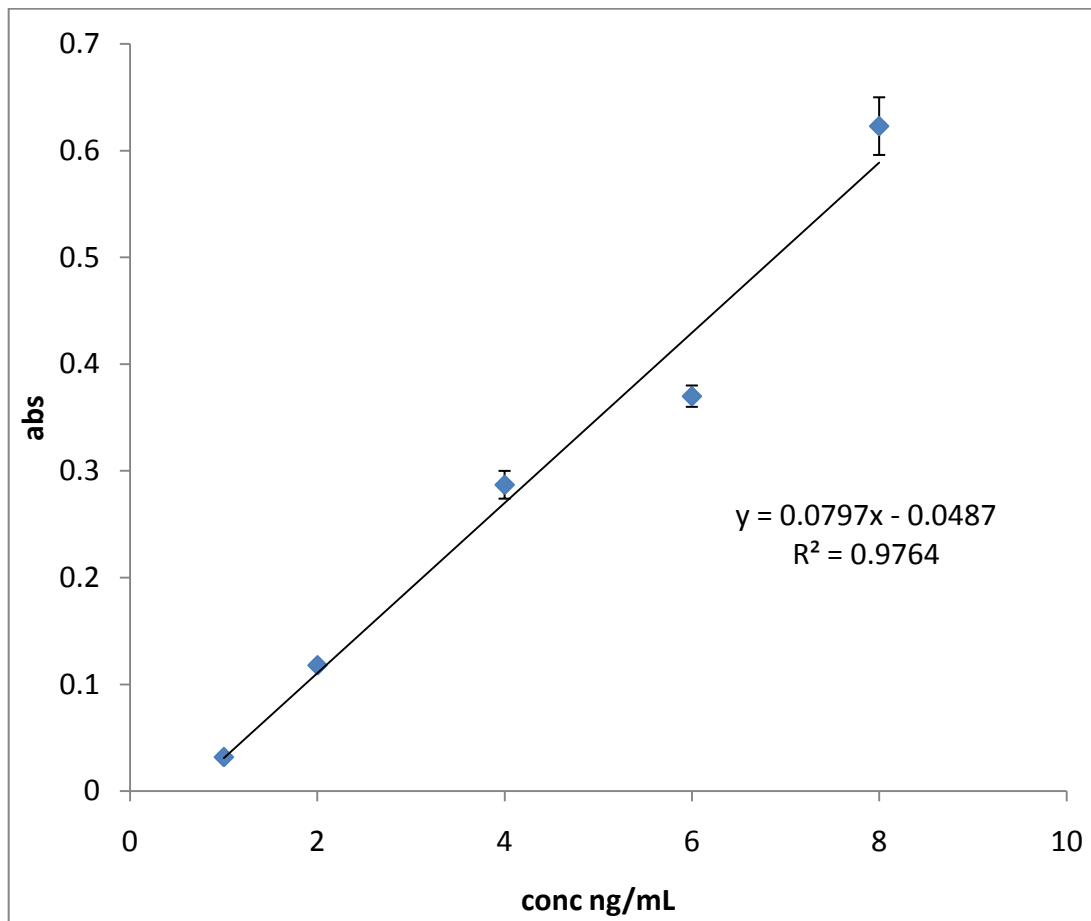
Tabla 25. Resta de ABS 450-ABS 570

Concentración ng/mL	Corrección (ABS 450-ABS 570)			\bar{X}	S	CV
	8	0,644	0,659			
6	0,421	0,403	0,418	0,414	0,010	2,329
4	0,329	0,345	0,319	0,331	0,013	3,962
2	0,158	0,162	0,164	0,161	0,003	1,894
1	0,078	0,073	0,077	0,076	0,003	3,481
0	0,043	0,044	0,044	0,044	0,001	1,322

Tabla 26. Corrección de ABS – Blanco

Concentración ng/mL	ABS-Blanco 0.044			Ecuación de la recta
	8	0,600	0,615	0,652
6	0,377	0,359	0,374	
4	0,285	0,301	0,275	Coefficiente de determinación
2	0,114	0,118	0,120	$r^2 = 0.9764$
1	0,034	0,029	0,033	

Figura 19. Grafica de la curva estándar para la cuantificación de interleucina



De acuerdo con la Guidance for Industry Bioanalytical Methods Validation for Human Studies, el coeficiente de determinación r^2 , es aceptado ya que el método empleado en esta cuantificación es de tipo biológico. Esta curva estándar se utilizó en para la cuantificación de IL-2 a lo largo del estudio.

Determinación de interleucina 2 en liposomas

- Prueba basal

Interleucina expuesta

Tabla 27. Lecturas de absorbancia.

Muestra	450 nm	570 nm	Corrección (ABS 450-ABS 570)	ABS-Blanco 0.044
1	0,204	0,050	0,154	0,110
2	0,191	0,051	0,140	0,096
3	0,203	0,051	0,152	0,108

Tabla 28. Concentraciones de IL-2

Muestra	Concentración ng	Concentración ng/mL	Concentración UI/mL
1	1,995	39,908	95,779
2	1,820	36,395	87,348
3	1,970	39,406	94,575

Tabla 29. Datos estadísticos

Promedio (\bar{X})	Desviación estándar	Coficiente de variación
92,567	4,560	4,926

En la tabla 27 se observan las absorbancias obtenidas de la lectura de la placa de ELISA, además la corrección del blanco. Posteriormente la tabla 28 nos muestra la conversión de nanogramos a UI/mL, que es la concentración de IL-2 que se encuentra expuesta (superficie del liposoma). El valor que se toma como referencia es el promedio de los análisis realizados.

- Prueba basal

Interleucina total

Tabla 30. Lecturas de absorbancia.

Muestra	450 nm	570 nm	Corrección (ABS 450-ABS 570)	ABS-Blanco 0.044
1	0,218	0,053	0,165	0,121
2	0,211	0,053	0,158	0,114
3	0,213	0,048	0,165	0,121

Tabla 31. Concentraciones de IL-2

Muestra	Concentración ng	Concentración ng/mL	Concentración UI/mL
1	2,133	42,668	102,404
2	2,046	40,912	98,188
3	2,133	42,668	102,404

Tabla 32. Datos estadísticos

Promedio (\bar{X})	Desviación estándar	Coefficiente de variación
100,999	2,434	2,410

En la tabla 30 se observan las absorbancias obtenidas de la lectura de la placa de ELISA, además la corrección del blanco. Posteriormente la tabla 31 nos muestra la conversión de nanogramos a UI/mL, que es la concentración de IL-2 total y que representa el tiempo cero del análisis químico. El valor de promedio de la tabla 32 es la base de comparación para los análisis mensuales posteriores.

- Prueba mes uno

Interleucina expuesta

Tabla 33. Lecturas de absorbancia.

Muestra	450 nm	570 nm	Corrección (ABS 450-ABS 570)	ABS-Blanco 0.072
1	0,193	0,044	0,149	0,077
2	0,192	0,046	0,146	0,074
3	0,190	0,046	0,144	0,072

Tabla 34. Concentración de IL-2

Muestra	Concentración ng	Concentración ng/mL	Concentración UI/mL
1	1,577	31,543	75,704
2	1,540	30,790	73,897
3	1,514	30,289	72,693

Tabla 35. Datos estadísticos

Promedio (\bar{X})	Desviación estándar	Coefficiente de variación
74,098	1,516	2,045

En la tabla 33 se observan las absorbancias obtenidas de la lectura de la placa de ELISA, además la corrección del blanco. Posteriormente la tabla 34 nos muestra la conversión de nanogramos a UI/mL, que es la concentración de IL-2 que se encuentra expuesta (superficie del liposoma). El valor promedio de la tabla 35 de los análisis es de 74.098 UI/mL, que representa una disminución del 19.96% del valor inicial.

- Prueba mes uno

Interleucina total

Tabla 36. Lecturas de absorbancia.

Muestra	450 nm	570 nm	Corrección (ABS 450-ABS 570)	ABS-Blanco 0.072
1	0,212	0,049	0,163	0,091
2	0,208	0,045	0,163	0,091
3	0,202	0,048	0,154	0,082

Tabla 37. Concentración de IL-2

Muestra	Concentración ng	Concentración ng/mL	Concentración UI/mL
1	1,753	35,056	84,136
2	1,753	35,056	84,136
3	1,640	32,798	78,715

Tabla 38. Datos estadísticos

Promedio (\bar{X})	Desviación estándar	Coefficiente de variación
82,329	3,129	3,801

En la tabla 36 se observan las absorbancias obtenidas de la lectura de la placa de ELISA, además la corrección del blanco. Posteriormente la tabla 37 nos muestra la conversión de nanogramos a UI/mL, que es la concentración de IL-2 total y que representa el tiempo cero del análisis químico. El valor promedio de la tabla 38 establece una disminución del 18.48% de la IL-2 total.

- Prueba mes dos

Interleucina expuesta

Tabla 39. Lecturas de absorbancia.

Muestra	450 nm	570 nm	Corrección (ABS 450-ABS 570)	ABS-Blanco 0.070
1	0,187	0,048	0,139	0,069
2	0,185	0,048	0,137	0,067
3	0,185	0,049	0,136	0.066

Tabla 40. Concentración de IL-2

Muestra	Concentración ng	Concentración ng/mL	Concentración UI/mL
1	1,477	29,535	70,886
2	1,452	29,033	69,681
3	1,439	28,782	69,079

Tabla 41. Datos estadísticos

Promedio (\bar{X})	Desviación estándar	Coefficiente de variación
69,882	0,920	0,013

En la tabla 39 se observan las absorbancias obtenidas de la lectura de la placa de ELISA, además la corrección del blanco. Posteriormente la tabla 40 nos muestra la conversión de nanogramos a UI/mL, que es la concentración de IL-2 que se encuentra expuesta (superficie del liposoma). El valor promedio de la tabla 41 de los análisis es de 69.88 UI/mL, que representa una disminución del 27.60% del valor inicial.

- Prueba mes dos

Interleucina total

Tabla 42. Lecturas de absorbancia.

Muestra	450 nm	570 nm	Corrección (ABS 450-ABS 570)	ABS-Blanco 0.070
1	0,188	0,046	0,142	0,072
2	0,191	0,047	0,144	0,074
3	0,191	0,046	0,145	0,075

Tabla 43. Concentración de IL-2

Muestra	Concentración ng	Concentración ng/mL	Concentración UI/mL
1	1,514	30,288	72,693
2	1,540	30,790	73,897
3	1,552	31,041	74,499

Tabla 44. Datos estadísticos

Promedio (\bar{X})	Desviación estándar	Coefficiente de variación
73,696	0,920	0,012

En la tabla 42 se observan las absorbancias obtenidas de la lectura de la placa de ELISA, además la corrección del blanco. Posteriormente la tabla 37 nos muestra la conversión de nanogramos a UI/mL, que es la concentración de IL-2 total. El valor promedio de la tabla 44 establece una disminución del 27.03% de la IL-2 total.

- Prueba mes tres

Interleucina expuesta

Tabla 45. Lecturas de absorbancia.

Muestra	450 nm	570 nm	Corrección (ABS 450-ABS 570)	ABS-Blanco 0.112
1	0,174	0,047	0,127	0,015
2	0,174	0,047	0,127	0,015
3	0,174	0,047	0,127	0,015

Tabla 46. Concentración de IL-2

Muestra	Concentración ng	Concentración ng/mL	Concentración UI/mL
1	0,799	15,985	38,363
2	0,799	15,985	38,363
3	0,799	15,985	38,363

Tabla 47. Datos estadísticos

Promedio (\bar{X})	Desviación estándar	Coefficiente de variación
38,3639	0,0	0,0

En la tabla 45 se observan las absorbancias obtenidas de la lectura de la placa de ELISA, además la corrección del blanco. Posteriormente la tabla 46 nos muestra la conversión de nanogramos a UI/mL, que es la concentración de IL-2 que se encuentra expuesta (superficie del liposoma). El valor promedio de la tabla 47 de los análisis es de 38.36 UI/mL, que representa una disminución del 60.25% del valor inicial.

- Prueba mes tres

Interleucina total

Tabla 48. Lecturas de absorbancia.

Muestra	450 nm	570 nm	Corrección (ABS 450-ABS 570)	ABS-Blanco 0.112
1	0,235	0,048	0,187	0,075
2	0,239	0,049	0,190	0,078
3	0,237	0,049	0,188	0,076

Tabla 49. Concentración de IL-2

Muestra	Concentración ng	Concentración ng/mL	Concentración UI/mL
1	1,552	31,041	74,499
2	1,590	31,794	76,306
3	1,565	31,292	75,101

Tabla 50. Datos estadísticos

Promedio (\bar{X})	Desviación estándar	Coefficiente de variación
75,302	0,920	1,222

En la tabla 48 se observan las absorbancias obtenidas de la lectura de la placa de ELISA, además la corrección del blanco. Posteriormente la tabla 49 nos muestra la conversión de nanogramos a UI/mL, que es la concentración de IL-2 total. El valor promedio de la tabla 50 establece una disminución del 25.43% de la IL-2 total.

- Prueba mes cuatro

Interleucina expuesta

Tabla 51. Lecturas de absorbancia.

Muestra	450 nm	570 nm	Corrección (ABS 450-ABS 570)	ABS-Blanco 0.060
1	0,147	0,046	0,101	0,041
2	0,136	0,045	0,091	0,031
3	0,145	0,046	0,099	0,039

Tabla 52. Concentración de IL-2

Muestra	Concentración ng	Concentración ng/mL	Concentración UI/mL
1	1,129	22,572	54,173
2	1,003	20,063	48,151
3	1,104	22,070	52,969

Tabla 53. Datos estadísticos

Promedio (\bar{X})	Desviación estándar	Coefficiente de variación
51,764	3,187	6,156

En la tabla 51 se observan las absorbancias obtenidas de la lectura de la placa de ELISA, además la corrección del blanco. Posteriormente la tabla 52 nos muestra la conversión de nanogramos a UI/mL, que es la concentración de IL-2 que se encuentra expuesta (superficie del liposoma). El valor promedio de la tabla 53 de los análisis es de 51.76 UI/mL, que representa una disminución del 44.07% del valor inicial.

- Prueba mes cuatro

Interleucina total

Tabla 54. Lecturas de absorbancia.

Muestra	450 nm	570 nm	Corrección (ABS 450-ABS 570)	ABS-Blanco 0.060
1	0,153	0,049	0,104	0,044
2	0,134	0,045	0,089	0,029
3	0,139	0,045	0,094	0,034

Tabla 55. Concentración de IL-2

Muestra	Concentración ng	Concentración ng/mL	Concentración UI/mL
1	1,166	23,325	55,980
2	0,978	19,561	46,946
3	1,041	20,816	49,957

Tabla 56. Datos estadísticos.

Promedio (\bar{X})	Desviación estándar	Coefficiente de variación
50,961	4,600	9,026

En la tabla 54 se observan las absorbancias obtenidas de la lectura de la placa de ELISA, además la corrección del blanco. Posteriormente la tabla 55 nos muestra la conversión de nanogramos a UI/mL, que es la concentración de IL-2 total. El valor promedio de la tabla 56 establece una disminución del 49.53% de la IL-2 total.

Fotografías de microscopía electrónica de transmisión a 80K de liposomas. Mes 1 de la prueba de estabilidad

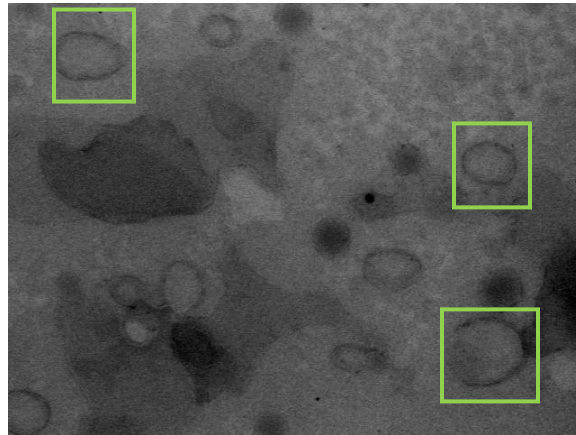
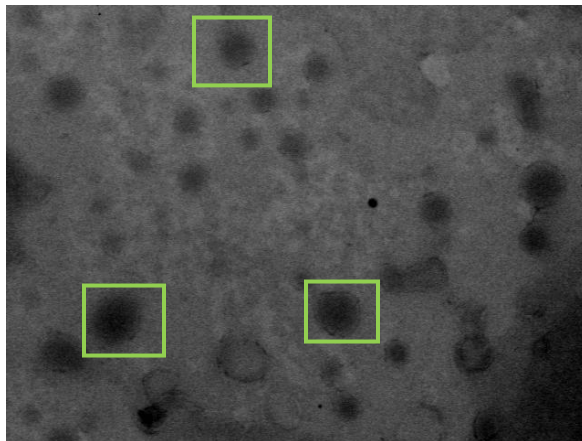


Figura 20



Fotografía 21

Los recuadros de color verde en las figuras 20 y 21 corresponden a imágenes de liposomas unilaminares que conservan su integridad después de un mes de haber sido sometidos a una temperatura de 25°C y 60% HR.

Fotografías de microscopía electrónica de transmisión a 80K de liposomas. Mes 5 de la prueba de estabilidad.

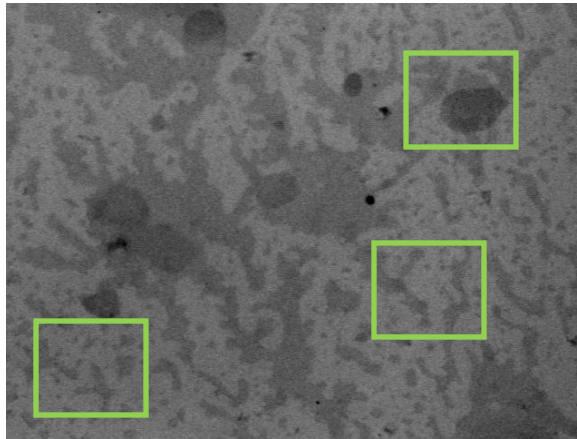


Figura 22

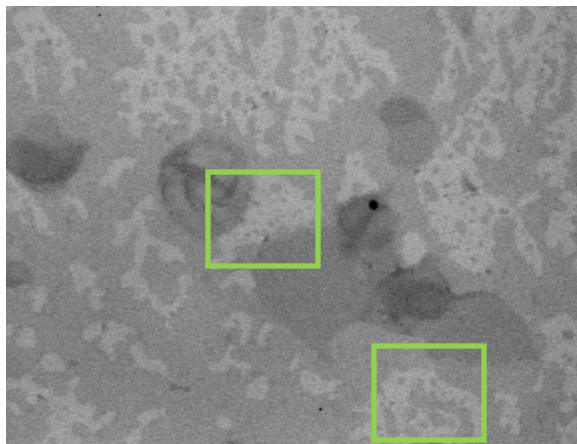


Figura 23

Los recuadros de color verde en las figuras 22 y 24 corresponden a imágenes de lípidos dispersos que corresponden a los liposomas del sistema en estudio, estas fotografías confirman la desintegración del sistema farmacéutico.



ANÁLISIS DE RESULTADOS

Durante el desarrollo del análisis mensual se observó un cambio progresivo en la degradación del sistema farmacéutico. En los primeros resultados obtenidos en el análisis del tiempo cero o prueba basal, que se muestran en la figura 1, se observan dos histogramas, el histograma A representa la relación directa entre el tamaño y la complejidad, donde la población está distribuida en dos áreas denotadas por los polígonos P1 y P4. La población que se analizó es la que se encuentra en el polígono P1, ya que la población que se encuentra en el polígono P4, representa la desviación de la población típica de la producción. Con este histograma podemos observar que nuestra población total no son los 10,000 eventos, sino la población que está dentro de la región P1. El histograma B, muestra una relación directa entre la complejidad y número de eventos además de sobreponer las 2 poblaciones antes mencionadas con el fin de observar su tendencia.

Posteriormente en el análisis del mes 1, el histograma A observado en la figura 2, nos muestra una disminución de la población en la región del polígono P4 y una concentración de la población en la parte inferior izquierda del polígono P1, este fenómeno nos indica que el sistema está perdiendo un poco de tamaño, este fenómeno provoca que aumente la población en el área del polígono P1. Como se puede observar, este fenómeno se sigue manteniendo en el análisis del mes 2. En el análisis del mes 3, se observa en la figura 4 una nueva población fuera de las áreas de los polígonos P1 y P4, esta población se ubica en el cuadrante superior derecho lo que nos indica un aumento de tamaño y complejidad, lo que representa una posible aglutinación de los liposomas. En el análisis del mes 4, este fenómeno se repite, además se observa otra población ubicada en la parte inferior



izquierda del histograma A de la figura 5. Esta nueva población refleja una pérdida total de la complejidad. Esta tendencia es más marcada en el análisis del mes 5, como se observa en la figura 6. A partir de lo descrito anteriormente es importante hacer el análisis por separado del tamaño (FSC) y la complejidad (SSC).

En la figura 7 el histograma, representa el análisis del tiempo cero o prueba basal del tamaño VS eventos, el programa Summit 4.3 estableció que de los 10,000 eventos analizados 9,008 eventos presentan las mismas características, por ello representa el 100% del valor inicial. En el análisis del mes 1, en la figura 8 el histograma (FSC VS Eventos), muestra una disminución del 2.90% del valor inicial, este valor se encuentra en el rango establecido de variación con respecto al valor inicial (no mayor al 5%). En el análisis del mes 2, en la figura 9, el histograma muestra un aumento del 1.26%, este fenómeno se puede relacionar a la tendencia observada en las figuras 2 y 3, esto debido a la posible aglutinación del sistema farmacéutico. En el análisis del mes 3, en la figura 10, el histograma muestra una disminución del 7.80% de la población, este valor rebasa el límite permitido de variación.

A partir de este análisis se puede considerar que se ha perdido la estabilidad del sistema. En el mes 4, la figura 11, muestra una disminución de solo el 1.46%, este fenómeno se asocia a la aglutinación de los liposomas, ya que en un análisis visual se observaron partículas blanquecinas, que no contenían en un principio los frascos viales. Esta tendencia es similar en el análisis del mes 5, como lo muestra la figura 6.



La figura 13 muestra el histograma que representa el análisis del tiempo cero o prueba basal de la complejidad VS eventos, el programa Summit 4.3 estableció que de los 10,000 eventos analizados 9,003 eventos presentan las mismas características, por ello representa el 100% del valor inicial. En el análisis del mes 1, la figura 14 muestra el histograma (SSC VS Eventos), donde se observa una disminución del 0.63% del valor inicial, en este punto se puede observar que la complejidad es más estable que el tamaño del sistema farmacéutico. Esta tendencia continua muy marcada en el análisis del mes 2 y 3, ya que como se puede observar en las figuras 15 y 16 respectivamente, la disminución con respecto al valor inicial es de 0.69%. En el análisis del mes 4, la figura 17 muestra el histograma, donde se observa una disminución del 8.68% con respecto al valor inicial, a partir de este análisis se establece que se ha perdido la estabilidad de la complejidad del sistema farmacéutico. El cambio es más drástico en el mes 5, ya que la figura 18 muestra el histograma, donde se observa una disminución del 17.98%.

Para confirmar lo observado en los análisis realizados, se tomaron fotografías por microscopia electrónica de transmisión del sistema farmacéutico al cumplirse un mes y 5 meses de someter al sistema a las condiciones antes establecida. En las figuras 21 y 22 del mes 1, se observa claramente los liposomas unilaminares. En las figuras 23 y 24 correspondientes al mes 5, se observa solo la presencia de lípido disperso, esto confirma la destrucción del sistema farmacéutico.

Para la cuantificación de la interleucina 2, se elaboro una curva estándar, con 5 concentraciones distintas, las valoraciones realizadas son aceptadas ya que como se observa en la tabla 25, los coeficientes de variación están por debajo del 5%, valores que son aprobados por la Guía de Validación de



Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. El valor obtenido de coeficiente de determinación fue de 0.976, este valor es aceptado y justificado por la Guidance for Industry Bioanalytical Methods Validation for Human, quien nos indica que para métodos bioanalíticos el valor aceptado para r^2 debe ser mayor o igual a 0.95. A partir de esta curva se realizaron los análisis posteriores.

Es importante destacar que en la cuantificación de IL-2, se tomaron dos parámetros importantes, la interleucina expuesta se refiere a la IL-2 que se encuentra en la superficie del liposoma y la total que comprende la IL-2 expuesta y la IL-2 encapsulada en el liposoma. En la prueba basal o tiempo cero, el valor inicial de la IL-2 expuesta es de 92.56 UI/mL y el valor total es de 100.99 UI/mL. En el análisis del mes 1, el valor de la IL-2 expuesta tiene un descenso de 19.96% y el valor de la IL-2 total tiene un descenso de 18.48% con respecto al valor inicial, en este análisis se considera que se ha perdido la estabilidad del sistema farmacéutico. Para el análisis del mes 2, el descenso de la IL-2 expuesta es de 27.60% y el de la IL-2 total es de 27.03%.

Un valor importante de subrayar es el que corresponde al análisis del mes 3, la disminución del valor de la IL-2 total es de 25.43%, este valor refleja un aumento si se compara con el valor del análisis del mes 2. Este fenómeno se debe a la aglutinación del sistema farmacéutico, esto fue causado durante el muestreo, ya que cuando se obtuvieron las muestras, estas no contenían uniformidad, para poder homogenizar las muestras era necesario sonicarlas, pero al realizar este proceso es inevitable la formación de liposomas, debido a que esta acción forma parte del proceso de fabricación.

Para la estabilidad física, los análisis se realizaron hasta el mes 5 y para la estabilidad química hasta el mes 4, esto debido a que se determinó que la



estabilidad se perdió antes de los 6 meses. Los análisis se siguieron desarrollando con fines de observar las tendencias de degradación.

Tomando en cuenta lo anterior se sugiere realizar la estabilidad a largo plazo, para evaluar el cambio en tiempo real en las condiciones óptimas de almacenamiento. Con los datos que se llegaran a obtener, se podría dar una alternativa de producción y administración, ya que si este sistema no puede estabilizarse por un tiempo óptimo, implicaría que la administración la tendría que realizar personal especializado y la producción del medicamento tendrá que llevarse a cabo en el momento de su administración.



CONCLUSIONES

Se evaluó la estabilidad del sistema farmacéutico constituido por IL-2 / Liposomas en un material de empaque primario, mismo que se utilizaría para su distribución.

Dentro de la estabilidad física se encontró que el parámetro más afectado fue el tamaño (FSC), ya que los liposomas se aglutinaron. La complejidad (SSC) del sistema se mantuvo dentro de las especificaciones hasta el tercer mes, posteriormente el descenso drástico de complejidad demuestra que solo existe lípido inerte.

El programa Summit 4.3 permitió realizar un análisis por separado de cada parámetro, lo que permitió ver los problemas que presentan los liposomas.

La estabilidad química fue afectada desde el primer mes de estudio, ya que a partir de la implantación de la técnica ELISA se pudo cuantificar la IL-2.

Fue posible confirmar los resultados de la estabilidad física y química con ayuda de fotografías obtenidas por Microscopia electrónica de transmisión.

Este estudio fue una primera aproximación al comportamiento del sistema farmacéutico en condiciones de almacenamiento a condiciones ambientales.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vallet María, Doadrio Luis. Liberación de fármacos en matrices biofarmacéuticas: avances y perspectivas. España: José Casas Gil; 2006.
2. Mosqueira Arturo. Diseño de medicamentos. España: Real academia de farmacia; 2004.
3. Organización Mundial de la Salud [sede Web]. Washington: OMS; 2008 [acceso 8 de marzo de 2011]. Cáncer cervicouterino, hoja informativa Disponible en: http://www.paho.org/Spanish/DD/PIN/ahora03_jul08.htm.
4. Organización Mundial de la Salud [sede Web]. Washington: OMS; 2008 [acceso 4 de marzo de 2011]. Vacuna contra el VPH: buscan superar obstáculos. Disponible en: http://www.paho.org/Spanish/DD/PIN/ahora03_jul08.htm.
5. Encourager l' utilisation de la technologie, l'innovation et la société de l'information pour la compétitivité. Aplicaciones industriales de la nanotecnología. [Monografía en internet]. 2008. Asturias: ESTIIC; [acceso 6 de noviembre de 2011]. Disponible: http://www.idepa.es/sites/web/idepaweb/Repositorios/galeria_descargas_idepa/AplicacionesIndustriales_Nanotecnologia.pdf.



6. Corona S.R., Corona M.T, Inventores; lugar, titular. Composición de un Producto Antineoplásico e Inmunoregulador y su Uso para el Tratamiento de Cáncer Cérvico Uterino. Patente mexicana. Expediente: MX/a/2008/008681.
7. Crommelin D., Sindelar R. Pharmaceutical biotechnology: Introduction for pharmacists and pharmaceutical scientists. 2 edición. USA: Editorial Routledge; 2002.
8. Corona T, Rangel R, Hernández M, Baeza I, Ibáñez M, Weiss B. Characterization of cationic liposomes having IL-2 expressed on the external surface, and their affinity to cervical cancer cells expressing the IL-2 receptor. J Drug Target (London). 2009;17 (7): 496-501
9. Aulton Michael. Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2 ed. España: El Sevier; 2004.
10. Ho R., Gibaldi M. Biotechnology and biopharmaceuticals: transforming proteins and genes in to drugs. Inglaterra: Editorial Wiley; 2003.
11. Walsh G. Biopharmaceuticals, biochemistry and biotechnology. 2 edición. Inglaterra: Editorial Wiley; 2003.
12. Vila José Luis. Nanotecnología farmacéutica. Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. España: Real academia nacional de farmacia; 2009.



13. Bolívar Francisco. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. México: Colegio nacional; 2004.
14. Walsh G. Pharmaceutical biotechnology: Concepts and applications. Inglaterra: Editorial Wiley; 2007
15. Bundavari S. coordinador. The Merck Index. 16a ed. New York: Merck and Co., Inc.; 2002
16. Rho J., Lovie G. Handbook of Pharmaceutical Biotechnology, New York: Pharmaceutical Products Press; 2003.
17. NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de fármacos y medicamentos. Diario Oficial de la Federación, (03-08-1996).
18. Yoshioka S., Stella V. Stability of drugs and dosage forms. USA: Editorial Kluwer academic/ plenum publishers; 2000.
19. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C; 4 Version. Parent Guideline Dated 30 November 1995
20. Longobardi A. Flow cytometry: first principles. USA: Editorias Wiley-Liss; 1999.



21. Jaroszeski M., Helled R., Flow cytometry protocols. USA: Editorial Humara press; 1998.
22. Alvarez A. Introducción a la citometria de flujo. Unidad de citometria, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, ISCIII, Madrid
23. Zwirner NW. ELISA. En: Aníbal MR, editor. Inmunología e Inmunoquímica, Fundamentos. 5^a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006. p. 798-820.
24. Von Roland. Compendio de inmunologia general. España: Editorial Acribia; 2008
25. Goldsby Rchard. Inmunologia. 5^a ed. México: Editorial Mc Graw Hill; 2006
26. Murphy Kenneth. Inmunologia de JENEWAY. 7^a ed. México: Editorial Mc Graw Hill interamericana; 2009
27. Kindt Thomas. Inmunologia de Kuby. 5^a ed. México: Editorial Mc Graw Hill interamericana; 2007
28. Rojas Oscar. Extra Inmunologia. 2^a ed. México: Editorial panamericana; 2001
29. Guía de Validación de Método Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México, A.C.



30. Guidance for Industry Bioanalytical Methods Validation for Human Studies, December 1998.