



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**“Proceso de estabilización de liposomas que contienen IL-2 mediante
criopreservación y redacción de la solicitud de patente”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

LETICIA XAHUANTITLA SALGADO

DIRECTOR DE TESIS: DR. BENNY WEISS STEIDER

ASESOR DE TESIS: DRA. MA. TERESA CORONA ORTEGA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 experimental fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ de la FES-Zaragoza, Campus II, UNAM; bajo la Dirección del Dr. Benny Weiss Steider y Asesoría de la Dra. Ma. Teresa Corona Ortega con financiamiento de los proyectos PAPIIT IN214113 y IN219315”

Agradecimientos

A Dios, por haberme dado la vida y la oportunidad de trazar un camino a su lado, por estar conmigo a cada paso, escucharme y atender mis peticiones, por sus dones, virtudes, amor y misericordia infinita, porque mientras me formaba en conocimiento de su palabra desarrollé habilidades que pude aplicar en mi formación como persona y como profesionista, por haber puesto a grandes personas y profesores al frente de cada grupo en el que estuve, porque me compartió a su madre quien mediante su intercesión hizo que cada oración llegara a él, y por haberme puesto en esta familia.

A mis padres Irene Salgado López y Lázaro Xahuantitla Zavala, quienes me han enseñado a ser una persona capaz de amar y dar todo por sus seres queridos y por aquellos que necesitan ayuda, han sido el mejor ejemplo que Dios me pudo dar, me han enseñado a conseguir lo que quiero con esfuerzo, trabajo, humildad, paciencia, empatía y disposición, han dado su confianza, apoyo incondicional y todo cuanto han tenido para que yo alcanzara mi meta. Me han dado todo.

A mis hermanos Mariana Xahuantitla Salgado y Lázaro Xahuantitla Salgado, porque también han estado conmigo en todo este trayecto, dándome su amor, apoyo incondicional y grandes momentos, son el mejor regalo que Dios me dio a través de mis padres.

A mi abuelita Ma. Esther López Martínez, mis tíos y primos, pues siempre han estado presentes en mi trayectoria incentivándome a ser mejor y brindándome apoyo.

Mi familia siempre irá conmigo, tal vez no físicamente pero si en cada acto, cada gesto, reacción, hábito y costumbres.

A la Dra. Ma. Teresa Corona Ortega, quien ha sido una gran asesora y persona, tolerante, empática, paciente y siempre disponible, ha depositado toda su confianza, buscado la manera de ayudarnos, proporcionado cada uno de los materiales, equipos, reactivos y espacios necesarios.

Al Dr. Benny Weiss Steider, por depositar su confianza, invertir tiempo, brindarnos conocimiento, disponibilidad, materiales, reactivos, espacio de trabajo, apoyo y asesoría.

Al Dr. Ramón Soto Vázquez, quien me invitó a formar parte de este proyecto y dio su asesoría desde octavo semestre, siempre al pendiente del trabajo y a pesar de que no se encuentra en la portada como mi asesora y mi director, hago constatar que Él también fue un asesor en este trabajo.

A estos tres Doctores porque me demostraron que las personas que más saben y más tienen son las más sencillas, humildes, disponibles, dedicadas y sobre todo dispuestos a enseñar todo cuanto saben, son aquellos que impulsan y promueven a sus alumnos a llevar el nombre de la UNAM a grandes niveles, son ejemplo de lo que significa ser de la UNAM y en especial de la FES-Zaragoza.

A la Dra. Rosalva Rangel Corona, por su paciencia, apoyo, tolerancia y accesibilidad.

A la M. Guadalupe Gómez García, quien nos brindó tiempo, asesoría y ayuda en la citometría de flujo durante todo el proyecto.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, director del laboratorio de Microscopia Electrónica Tlahuizcalpan de la Facultad de ciencias-UNAM y **a la Mtra. Reyna**

Lara Martínez por permitirme usar sus instalaciones, equipo y brindarme asesoría durante las lecturas en el microscopio electrónico de transmisión.

Al Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, por la asesoría e información de la síntesis del espermidil-colesterol.

Al Dr. Adelfo Reyes Ramírez por su asesoría y disposición en la síntesis del Espermidil-colesterol.

Al Dr. Rubén Marroquín Segura por permitirme tomar su curso de inmunología.

A la Mtra. Leticia Huerta Flores y la Mtra. Rosalba Barrera Martínez, quienes dedicaron su esfuerzo y tiempo en este trabajo.

Al Q.F.B. Cristian Cruz Vázquez quien me ayudó dentro del laboratorio y me brindó su amistad.

A cada uno de los que fueron mis profesores a lo largo de mi desarrollo escolar.

A mis amigos, por su apoyo, empatía y complicidad.

A los Pbro. David Granillo Portillo y Felipe de Jesús García Carmona por su amistad y guía espiritual durante mi trayectoria escolar.

Al señor José Chavarría Mancilla, quien se encargó de que los materiales de trabajo siempre estuvieran limpios, accesibles y en su caso estériles.

Y finalmente a la **Universidad Nacional Autónoma de México** que a través del **Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Naucalpan** y la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, me ha permitido llegar hasta la culminación de mis estudios profesionales, formándome en el aspecto académico y humano a través de los mejores profesores del país, siempre portaré con orgullo y enalteceré a mi universidad.

**Dedicado a Dios y a mis padres Irene Salgado López y Lázaro Xahuantitla
Zavala.**

“ Cuando quieres realmente una cosa, todo el Universo conspira para ayudarte a conseguirla. ” Paulo Coelho

Índice

Agradecimientos.....	2
1. Introducción.....	8
2. Marco Teórico.....	9
2.1 Cáncer.....	9
2.2 Tratamientos contra el cáncer.....	11
2.3 Biotecnología.....	12
2.4 Biotecnológicos en México.....	14
2.5 Nanotecnología.....	17
2.6 Liposomas.....	19
2.6.1 Aplicación.....	22
2.6.2 Liposomas y la industria farmacéutica.....	22
2.7 Interleucinas.....	24
2.7.1 Interleucina 2.....	25
2.8 Desarrollo farmacéutico.....	26
2.8.1 Preformulación.....	26
2.8.2 Formulación.....	27
2.8.3 Optimización.....	28
2.9 Criopreservadores.....	29
2.10 Propiedad intelectual- Patentes.....	30
2.10.1 Patentes en México.....	36
3. Planteamiento del problema.....	38
4. Objetivo General.....	40
4.1 Objetivos específicos.....	40
5. Hipótesis.....	41
6. Diseño experimental.....	42
7. Material y métodos.....	43
8. Resultados.....	50
9. Discusión.....	63
10. Conclusiones.....	66
11. Referencias.....	67

1. Introducción

Los procesos de estabilización farmacéutica consisten en la optimización de una formulación con el fin de que prolonguen su tiempo de vida. En el presente trabajo se propone la estabilización por criopreservación de un sistema nanoacarreador de tipo lipídico (liposomas), creado en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, para el transporte de una citocina inmunorreguladora llamada Interleucina 2 (IL-2), descrito en la Patente Mexicana 330174. Desafortunadamente en el sistema nanoacarreador descrito en la patente mencionada, aunque es estable en refrigeración hasta por seis meses, la interleucina 2 pierde su actividad biológica desde el primer mes. Las condiciones ideales en las que se almacena el agente terapéutico deben ser bajo congelación, sin embargo, este proceso promueve la formación de cristales de hielo en el interior causando el rompimiento del nanoacarreador, dejando a la IL-2 libre y exponiendo a la manifestación de efectos adversos ligados a ésta.

Por lo anterior, en el presente trabajo se desarrolló un proceso de estabilización mediante el uso de un agente criopreservador que promueve la disminución de formación de cristales, permitiendo que el sistema nanoacarreador-citocina tenga mayor tiempo de vida. Aunado a lo anterior, el proceso de estabilización por criopreservación puede estar sujeto a protección como una patente de proceso asociada a la patente del sistema nanoacarreador ya concedida, por lo que de ser concedida aumentaría el tiempo de protección de la patente del sistema nanoacarreador; por esta razón también se redactó la solicitud de patente de proceso correspondiente.

2. Marco Teórico

2.1 Cáncer

El término cáncer puede definirse como aquella situación patológica cuya principal característica es la proliferación celular incontrolada, en la que las células se encuentran comprometidas en sufrir mitosis indefinidamente.^{1,2} Las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático. Hay más de 100 diferentes tipos de cáncer.³

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial; en 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertes. Los tipos más frecuentes de cáncer son diferentes en el hombre y en la mujer. Las infecciones que pueden provocar cáncer, como las causadas por los virus de las hepatitis B y C y el del papiloma humano, son responsables del 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medianos y del 7% en los países de ingresos altos. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 en las próximas dos décadas.⁴

Entre los principales tipos de cáncer en mujeres se encuentran el de seno, colon y recto, pulmones y bronquios, cuello uterino, estómago e hígado⁵

El cáncer cérvico uterino es un tipo frecuente de cáncer en mujeres, y consiste en una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos del cuello uterino.

Es la primera causa de muerte por cáncer maligno en mujeres de 25 a 64 años de edad y el tercero en mortalidad relacionada con los tumores malignos en la población en general.⁶

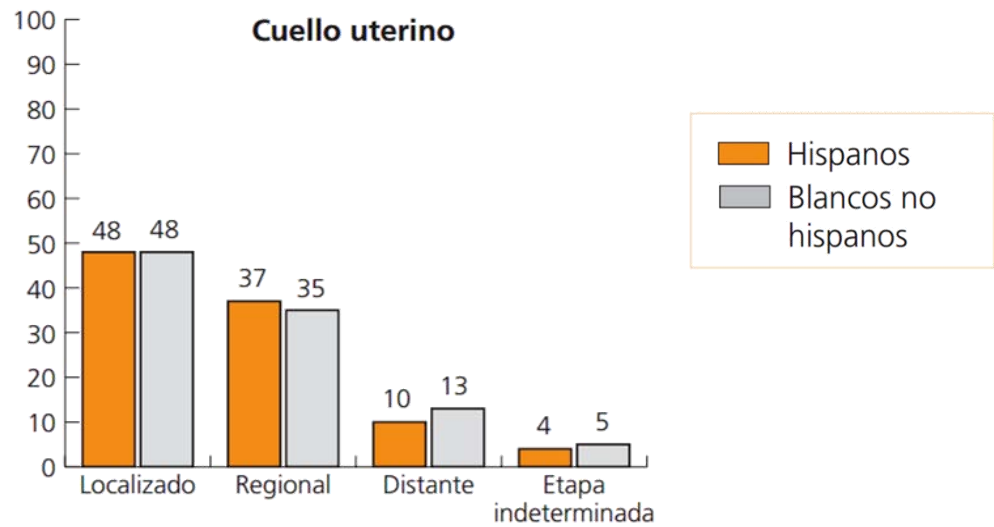


Figura 1. Distribución por etapas de cáncer de cuello uterino en hispanos y blancos no hispanos, 2005-2009.

Nota: Es posible que los porcentajes no sumen un total de 100 debido a que se redondearon los números. Las personas de origen hispano/latino pueden ser de cualquier raza. **Fuente de los datos: Programa de vigilancia, Epidemiología y Resultados finales (Surveillance, Epidemiology, and End Results, SEER), 18 registros SEER, División de control de Cáncer y Ciencias de la población, Instituto Nacional del Cáncer, 2012.**

El cáncer de cuello uterino está asociado en más del 90% de los casos al virus del papiloma humano (VPH)⁷. La infección persistente con el virus del papiloma humano (VPH) causa casi todos los cánceres de cuello uterino y anales, aproximadamente un 40% de otros cánceres genitales (p. ej., vaginal, vulvar, de pene), y una creciente proporción de cánceres de cabeza y cuello.^{8,9,10} Hay más de 100 tipos del VPH, y sólo 12 de ellos causan cáncer. Los tipos 16 y 18 del VPH representan aproximadamente un 70% de todos los casos de cáncer de cuello uterino y casi todos los demás cánceres relacionados con el VPH.^{9,11}

El cáncer de cuello uterino es uno de los dos únicos cánceres (el otro es el cáncer de colon y recto) que realmente se puede prevenir mediante los exámenes de detección) y la eliminación de lesiones precancerosas.

2.2 Tratamientos contra el cáncer

El pronóstico (posibilidades de recuperación) y selección de tratamiento, dependen de la etapa en que se encuentra el cáncer (si está sólo en el cuello uterino o si se ha diseminado a otros lugares) y del estado de salud en general de la paciente.

El tratamiento puede ser farmacológico (con medicamentos), conservador (es aquel en el que se extrae o destruye solo el tejido lesionado manteniendo el resto del órgano, de tal forma que después cicatriza y recupera su forma y función normal, por ejemplo la cirugía) o bien oncológico: radioterapia (radiaciones de alta energía para eliminar las células cancerosas) y quimioterapia (medicamentos especiales para eliminar las células cancerosas).¹²

Debido a la destrucción indiscriminada de células normales, la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos, así como al desarrollo de células tumorales resistentes a múltiples drogas, se han desarrollado investigaciones para encontrar tratamientos novedosos que se dirijan a las células tumorales basados en el conocimiento de su biología molecular, en donde dichos tratamientos novedosos son dirigidos específicamente a las células tumorales para bloquear las vías de

transducción de proteínas específicas y producir su muerte por apoptosis, minimizando los efectos adversos indeseables en las células sanas.

2.3 Biotecnología

La Biotecnología es sin duda, una de las áreas tecnológicas clave en el desarrollo industrial contemporáneo. El término biotecnología es considerado como el conjunto de técnicas que utilizan organismos vivos o sustancias provenientes de éstos para elaborar o modificar un producto, mejorar plantas o animales, o para desarrollar microorganismos para usos específicos.¹³ Este conjunto de conocimientos y herramientas constituyen no solamente un activo campo de investigación y generación de nuevo conocimiento, sino un motor económico para la industria y el desarrollo sustentable de toda una región, aprovechando la tecnología, la materia y la energía de origen biológico a favor del ser humano.¹⁴

Las compañías farmacéuticas han optado por la creación de medicamentos más complejos como una estrategia para combatir la expiración de las patentes. Diversas empresas han decidido ampliar su línea de negocios por medio de la fabricación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades oncológicas, inmunológicas e inflamatorias. Se espera que la biotecnología sea el pilar del progreso innovador de la industria farmacéutica.¹⁵

De acuerdo con el especialista Pierre Douzou,¹⁶ separa a la biotecnología en tres etapas: la primera la considera empírica y es cuando la biotecnología nace con el establecimiento de las sociedades humanas y su necesidad de desarrollar

organismos que le permitieran mantener asegurada la alimentación, la industria y lograr su expansión territorial. Una segunda etapa importante referida como la de transición se presenta con la intervención de la Ciencia y la Técnica en el desarrollo de industrias biotecnológicas que contribuyen al desarrollo de los grandes imperios. Y la tercer etapa se da con el nacimiento de la biotecnología moderna, con la conjunción de dos situaciones relevantes: la primera, es la aparición de la biología molecular, disciplina que permitió descifrar en los años cincuenta la estructura del DNA, material genético de los seres vivos y los genes que lo conforman, así como de los mecanismos para traducir la información genética que se localiza en el DNA, en proteínas; la segunda situación de la biología molecular es la concientización de que la ciencia se transforma a un tipo de actividad mucho más multidisciplinaria dándose la convergencia de varias estrategias, conocimientos y herramientas, vislumbrando el éxito para solucionar problemas científicos y sociales.¹⁷

La biotecnología, es entonces un conjunto de tecnologías basadas en la aplicación conjunta y sinérgica de ciencias básicas bien establecidas. No es una ciencia básica; es un tipo de tecnología y, por tanto, contribuye con soluciones técnicas susceptibles de aplicación industrial, a la generación de procesos, productos o servicios. A diferencia de las ciencias básicas, la biotecnología debe articular el conocimiento nuevo con la producción y con el mercado. Sólo eso distingue a la biotecnología de las ciencias biológicas fundamentales.

Los avances de la biología fundamental y de la bioquímica básica, se utilizan de manera intensiva en el desarrollo de nuevas biotecnologías.¹⁴

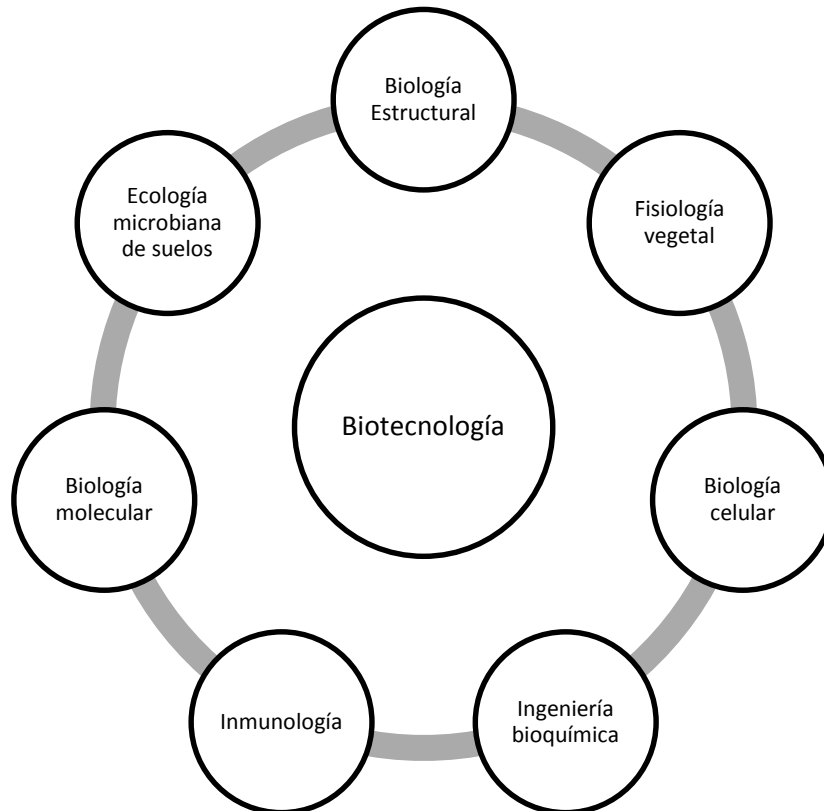


Figura 2. La biotecnología como actividad multidisciplinaria, sustentada en varias disciplinas (Bolívar, 2003).

La biotecnología puede ser clasificada en seis áreas principales: Animal, Industrial, Vegetal, Alimenticia, Ambiental, Humana.

2.4 Biotecnológicos en México

Durante las últimas décadas la biotecnología ha logrado una evolución acelerada, debido a que es una nueva alternativa de producción y obtención de patentes, esta disciplina es una de las que mayor impacto ha tenido en diversos sectores económicos.

La biotecnología es una de las áreas del conocimiento científico que ha logrado una evolución más acelerada en las últimas décadas y una de las que mayor impacto ha tenido en el desarrollo de diversos sectores económicos, en particular las orientadas al mejoramiento en salud, producción agrícola, producción pecuaria, prevención del deterioro y mejoramiento del ambiente, así como a la transformación industrial orientada a la producción de bienes diversos, fármacos y alimentos.

Países que contaban con un nivel de desarrollo comparable al de México en la década de los 80's, en el siglo pasado, han basado su crecimiento económico en el desarrollo de biotecnología. Canadá, España, Italia, Corea del Sur y Cuba, han desarrollado la industria con importantes éxitos comerciales provenientes de la biotecnología. En la actualidad, países de Sudamérica y Europa Oriental desarrollan también procesos y productos basados en biotecnología para la generación de empresas productivas.

En México, a instancias de un grupo académico del área de biotecnología, en 1985 se realizó con financiamiento del CONACYT un proyecto denominado "Prospectiva de la Biotecnología en México", en el cual se planteó lo que podría ser el futuro de esta disciplina y se identificaron barreras de entrada. En el cuadro 1 se presenta un listado de los principales productos y empresas que constituían la bioindustria de ese entonces, utilizando la llamada biotecnología tradicional (procesos biológicos en donde no se utiliza la ingeniería genética ni la biología molecular); sin duda nuestro país era un líder latinoamericano seguido por Argentina y Brasil.¹⁴

Cuadro 1. Industria Biotecnológica en México en los años 80's

Productos	Empresas
Cerveza	Cervecería Modelo Cervecería Cuauhtémoc Cervecería Moctezuma Cervecería Yucateca
Vinos y brandies	68 empresas
Derivados lácteos	431 empresas
Levadura para panificación	Ácidos Orgánicos, S. A. Industria Mexicana de Alimentos, S. A. de C.* Fleischman
Alcohol etílico	Asociación Nacional de Productos de Alcohol
Alcohol acético	Compañía Beneficiadora del Coyol, S. A.
Antibióticos	Fermic, S. A. de C. V.* Orsabe, S. A. * Cyanamid de México, S. A. * Pfizer, S. A. de C. V. * Centro Industrial Bioquímico, S. A. ** Upjohn, S. A. de C. V.* Abbot Laboratorios de México, S.A. * Sinbiotik, Beneficiadora e Industrializadora, S. A. *
Enzimas	Enmex, S. A. * Velfer, S. A. * Pfizer, S. A. *
Aminoácidos	Fermentaciones Mexicanas, S. A. (FERMEX)*
Ácidos orgánicos	Mexama*.
Biofertilizantes	Nitragin, S. A. Diamond Shamrock Pagador Química Lucava

Nota: *han cerrado operaciones, **paso a ser propiedad de una transnacional.

Fuente de obtención de cuadro: Quintero, R., (1985), Prospectiva de la biotecnología en México, CONACYT/ Fundación Javier Barros Sierra, A. C., México, D. F

En el cuadro 2 se presenta la cantidad de empresas dedicadas a la biotecnología en México.

Cuadro 2. Empresas biotecnológicas actuales en México

Sector	Número
Alimentos (se incluye bebidas)	+ 500
Farmacéutico	5
Medio ambiente	+ 150
Agrícola	27
Pecuario	13

Fuente de obtención de cuadro: Quintero, R. (2007). Situación de la biotecnología y genómica en México: investigación, formación de recursos humanos e industria, en Educación, ciencia, tecnología y competitividad. Agenda para el Desarrollo, Vol. 10, J. L. Calva (Ed.), Miguel Angel Porrúa/ Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 214-230

Algunas empresas mexicanas dedicadas actualmente a la farmacología y biotecnología¹⁵: Silanes, Arlex, Probiomed, Landsteiner Scientific.

2.5 Nanotecnología

La nanotecnología es un concepto que indica la capacidad de trabajar en escala de entre 1 y 100 nm, para comprender, crear, caracterizar y usar estructuras, materiales y sistemas con nuevas propiedades derivadas de su pequeño tamaño. Así, las nanopartículas se definen como aquellas partículas con dimensiones de hasta 100 nm en cada una de las dimensiones.¹⁸

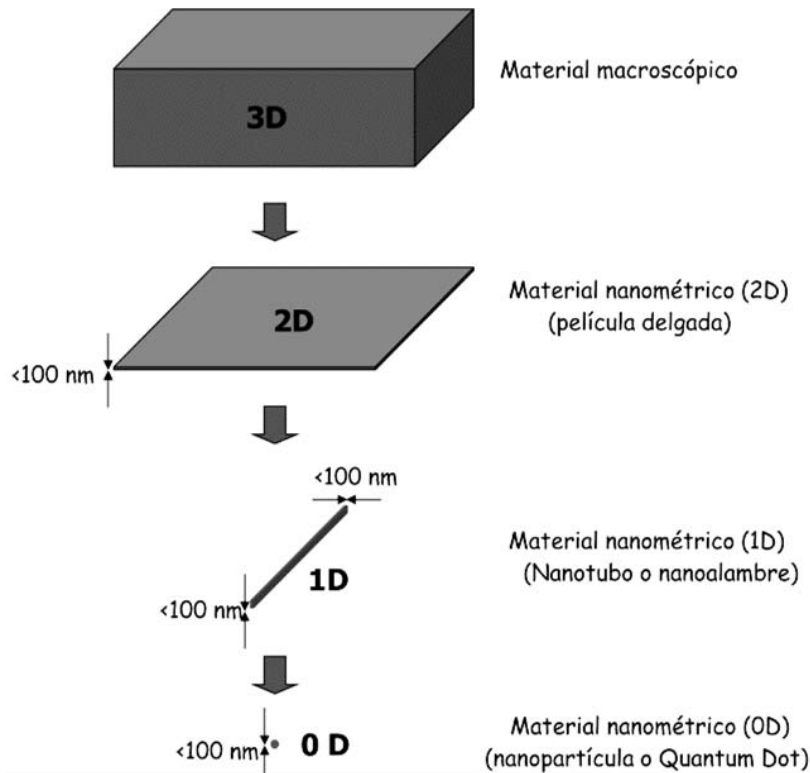


Figura 3. Representación de la escala nanométrica. Diferentes dimensiones del material con una dimensión en tamaño nanométrico, dos dimensiones en tamaño nanométrico y finalmente las tres dimensiones en tamaño nanométrico.

El desarrollo y la difusión de las nanotecnologías auguran un sustantivo impacto en las técnicas y los procesos de producción industrial y, en consecuencia, en el desarrollo económico y social. La velocidad de la difusión de las nanotecnologías se advierte en la creciente y la diversidad de productos que las han incorporado: desde procesadores electrónicos hasta cosméticos, pasando por medicamentos, textiles y levas para motores de automóviles y de aviones. Su notable avance en las principales economías de mundo va acompañado de montos sustantivos de financiamiento público y privado para su investigación y desarrollo. En vías de un potencial desempeño comercial e industrial, las nanotecnologías conforman un

campo que progresa rápidamente en descubrimientos e innovaciones. El dinamismo de la innovación en esta área se constata por un sustantivo crecimiento de las patentes nanotecnológicas. En efecto, las nanotecnologías prometen una enorme aplicación potencial en los ámbitos de la economía, la medicina y la protección del medio ambiente.¹⁹

2.6 Liposomas

Los liposomas fueron descubiertos en 1961 por el hematólogo británico Sir Alec D. Bangham mientras estudiaba un tipo de biomoléculas, los fosfolípidos (FL) y su relación con la coagulación sanguínea.²⁰ Desde entonces, se han convertido en herramientas versátiles en Biología, Bioquímica y Medicina.

Los liposomas son vesículas preparadas artificialmente, de talla nanométrica (aunque algunas pueden alcanzar tamaños mayores) y forma aproximadamente esférica con una fase acuosa interna rodeada por una o más bicapas lipídicas. Bangham descubrió que los FL en agua forman inmediatamente esferas cuyas paredes se encuentran organizadas en bicapas debido a que cada molécula tiene una terminal hidrosoluble en tanto el otro es hidrofóbico, es decir se trata de moléculas anfifílicas.

Los lípidos que los constituyen pueden ser de origen natural o sintético, y se caracterizan por presentar una parte polar (cabeza) y otra parte hidrófoba (cola), que les confieren propiedades anfifílicas.²¹ Sus características son las siguientes:

- Parte polar. Puede ser no iónica o estar cargada positiva o negativamente. Suele ser un fosfo o glicogrupos esterificados con distintos grupos, que da lugar a diferentes lípidos polares.
- Parte apolar. Consiste normalmente en una o dos cadenas de ácidos grasos de 14-18C de longitud, saturados o insaturados (de 1 a 4 dobles enlaces).

Los lípidos pueden contener también un «grupo esqueleto» que sirve de puente entre la parte polar y la apolar. Este grupo es generalmente glicerol o esfingosina, y da lugar a los denominados glicerolípidos y esfingolípidos. Cuando la cabeza polar está unida directamente al ácido graso nos encontramos ante lípidos de cadena simple, mientras que si existe una molécula esqueleto se pueden obtener lípidos tanto de cadena simple como de doble cadena. Su estructura depende de la naturaleza química, longitud y grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas presentes, el pH y la carga iónica de la fase acuosa. Este tipo de moléculas no son solubles en agua, sino que forman dispersiones coloidales. La parte polar o cabeza se dispone de tal forma que encierra el compartimiento acuoso, mientras que las colas se orientan enfrentadas entre sí, dando lugar a la formación de la bicapa.

Los fosfolípidos son los lípidos más comúnmente utilizados en la elaboración de liposomas. La variabilidad de éstos estriba en el grupo que se une al fosfato. Así, se pueden unir aminoalcoholes (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina), aminoácidos (fosfatidilserina), alcoholes (fosfatidilglicerol) y azúcares

(fosfatidilinositol). Dentro de los fosfolípidos, la lecitina (fosfatidilcolina) es la más utilizada, puesto que es fácilmente extraíble de la yema de huevo y de la semilla de soya.²²

Las vesículas formadas por fosfolípidos son usadas como modelo para estudiar el comportamiento de membranas biológicas, debido a que muestran similitudes como pueden ser su estructura, composición, selectividad y permeabilidad selectiva. En los años 70, Gregoriadis inició el estudio sobre el potencial que presentan éstos como sistemas de liberación de fármacos o de otras moléculas bioactivas.

Los liposomas son excelentes vehículos de administración de fármacos, debido a su naturaleza biodegradable y no tóxica. La ampliación de las aplicaciones en las que se utilizan liposomas es debido a que son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también las de carácter anfifílico. Además algunas de sus propiedades físicas como carga superficial, tamaño, permeabilidad y rigidez de la pared, o su capacidad de carga son fácilmente modulables debido a la amplia variedad de fosfolípidos que existen. Por último, si se utilizan lípidos funcionalizados, se pueden unir anticuerpos u otros ligandos a la superficie del liposoma, lo que les convierte en sistemas que pueden acceder con mayor facilidad a determinados tejidos, por ejemplo tumorales, acercándose al concepto que Helrich introdujo denominándolo “bala mágica”. Muchas formulaciones de liposomas para quimioterapia han sido aprobadas por la FDA o han entrado a evaluaciones preclínicas y clínicas.

Para que los liposomas se formen es necesario que se alcance una concentración mínima, conocida como concentración vesicular crítica (cvc).²³ Además de este parámetro, las disoluciones vesiculares se caracterizan por la lamellaridad vesicular (número de bicapas), la polidispersidad de tamaños y la micropolaridad de los diferentes microentornos vesiculares.²⁴

2.6.1 Aplicación

Desde el punto de vista de aplicaciones de los liposomas como consecuencia de las modificaciones que, con diferentes fines, se hayan podido introducir en su estructura, se distinguen los siguientes tipos de liposomas:

- Liposomas convencionales.
- Liposomas de circulación prolongada o stealth liposomas.
- Liposomas catiónicos.
- Inmunoliposomas.

2.6.2 Liposomas y la industria farmacéutica

En el sector farmacéutico los liposomas utilizados están formados principalmente por fosfatidilcolina. Este lípido es el principal componente de la membrana celular, por lo que los liposomas se difunden en los tejidos con mucha facilidad. Se utilizan como vía de encapsulación de moléculas y principios activos ya sean hidrosolubles o liposolubles y para la diagnosis y tratamiento de infinidad de enfermedades, como el cáncer y ya en los últimos años en la terapia génica.^{25,26}

La liberación de fármacos constituye un campo importante tanto por la relación dosis/actividad, como la aplicación puntual del medicamento sin tener que recurrir a la invasión generalizada del organismo cuando solo sea necesario en un determinado punto del organismo. En principio, un sistema de liberación de fármacos debe controlar el lugar apropiado para el principio activo y el momento adecuado de dosificación. Los primeros sistemas se centraban en perfiles constantes (cinéticas de orden cero) para evitar problemas asociados a la administración convencional necesaria en el tratamiento de enfermedades crónicas. En la actualidad, los nuevos sistemas de liberación de fármacos incluyen la optimización en la acción hacia los tejidos y de las formas de dosificación para conseguir una respuesta adecuada con mínimo efecto no deseable. Además se intenta que cubran otras necesidades como conseguir una liberación lenta de fármacos hidrosolubles, mejorar la biodisponibilidad de medicamentos poco solubles en disoluciones acuosas, desarrollar unos contenedores biodegradables y controlar la liberación de medicamentos tóxicos.

Después de un largo periodo de investigación y esfuerzos de desarrollo, las formulaciones de fármacos en liposomas han entrado en las clínicas para tratar cáncer e infecciones fúngicas sistémicas y locales, principalmente porque son biológicamente inertes y biocompatibles y prácticamente no causan reacciones tóxicas o antigénicas no deseadas.²⁷

Para conseguir este tipo de sistemas, las investigaciones actuales siguen tres criterios independientes: el tiempo de dosificación, el punto de aplicación y la

sensibilidad al estímulo-respuesta. Además de tener en cuenta cualquiera de los criterios comentados, hay que tener en cuenta varios aspectos referentes a sus componentes y al método de preparación que se pueden resumir en los siguientes:

- Cuanto más elevada es la concentración del lípido, mayor es la proporción de la fase acuosa atrapada y además su vida media aumentará.
- El índice de encapsulación aumenta al realizar la hidratación lentamente.
- La adición de fosfolípidos cargados que hace más grande la distancia entre las membranas lipídicas, aumenta la cantidad de sustancia liposoluble que puede ser encapsulada entre la bicapa lipídica.

El método de preparación se elegirá en función de la composición, tipo de liposoma y naturaleza del principio activo que se pretende incluir en el sistema.

2.7 Interleucinas

La comunicación entre células inmunes e inflamatorias es mediada en gran parte por proteínas llamadas interleucinas, que promueven crecimiento, diferenciación y activación celular. Estas moléculas efectoras son producidas transitoriamente y controlan localmente la amplitud y duración de la respuesta.²⁸

Las interleucinas son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades. Además de las células del sistema inmune, éstas son producidas por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Son el principal medio de comunicación intracelular ante una

invasión microbiana. Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica²⁹

2.7.1 Interleucina 2

La IL-2 es una proteína de 15 kDa, producida principalmente por células-T-CD4, y en una menor cantidad, por células-T-CD8+. Actúa por medio de los receptores IL-2R α , IL-2R β y IL-2R γ , usando la vía intracelular JAK/STAT (Familia Janus de tirosinocinasas/ factores de transcripción) para estimular el crecimiento y la proliferación de linfocitos-T y células-B. También induce a la producción de otras citocinas, como, por ejemplo, IFN γ y FNT β , lo que resulta en la activación de los monocitos, neutrófilos y células NK (natural killer). De esa forma, queda demostrado que la IL-2 contribuye para la generación y la propagación de las respuestas inmunológicas específicas del antígeno.^{30,31} En función de que su vida media plasmática es inferior a los 10 minutos, la IL-2 normalmente no se detecta en las lesiones agudas.³² La IL-2 ha venido siendo extensamente estudiada en aplicaciones clínicas, tales como la terapia oncológica, la inmunodeficiencia y el rechazo a los trasplantes.³³

2.8 Desarrollo farmacéutico

El objetivo del desarrollo farmacéutico es el diseño de un protocolo de calidad y su proceso de fabricación para lograr una respuesta terapéutica previsible a una sustancia activa que forma parte de una formulación y que pueda fabricarse a gran escala con una calidad reproducible en la cual han de cumplirse múltiples condiciones como la estabilidad química y física.

Las etapas de desarrollo farmacéutico son:

- Revisión bibliográfica/Planeación
- Preformulación
- Formulación
- Optimización
- Escalamiento
- Estabilidad

2.8.1 Preformulación

La preformulación puede describirse como el proceso de investigación y desarrollo de una sustancia activa, a través de la determinación y/o caracterización de las propiedades físicas y químicas fundamentales, tanto en sólido como en solución, consideradas importantes en la formulación de una forma de dosificación estable, eficaz y segura, además durante esta caracterización es posible conocer las

interacciones con los diversos componentes destinados a ser utilizados en el producto final. Es decir, las pruebas de preformulación abarcan todos los estudios sobre la composición de una sustancia activa con el fin de obtener información útil para la posterior formulación de una forma de dosificación biofarmacéuticamente estable.

La preformulación está conformada por distintas etapas:

- a) Caracterización de la sustancia activa
- b) Estabilidad intrínseca
- c) Compatibilidad sustancia activa-excipiente

2.8.2 Formulación

Durante esta etapa se describe el tipo de forma de dosificación seleccionada y la formulación propuesta.

Al formular un producto se debe tener en cuenta:

- Evaluar la viabilidad del proyecto en términos comerciales y técnicos.
- Evitar el desperdicio de recursos valiosos en el desarrollo de un producto que no es necesario o deseado.
- Consideraciones comerciales y de marketing.
- Consideraciones de propiedad intelectual.
- Consideraciones ambientales y de salud.
- Evaluación de la seguridad.^{34, 35, 36, 37}

2.8.3 Optimización

La optimización del proceso definirá e investigará los parámetros críticos del proceso, variando éstos dentro de las limitaciones prácticas, dentro de las cuales puede ser fabricado un producto, es decir, identificará todos los parámetros del proceso, que podrían afectar a la calidad y/o rendimiento del producto. Los parámetros críticos pueden incluir:

- Definición de la orden de adición de la sustancia activa y excipiente.
- Definición de la configuración óptima de los equipos.
- Optimización del tiempo según los parámetros del proceso.
- Definir el rango de temperatura óptimo.
- Desarrollo de procedimientos de limpieza para el proceso.³⁹

Una vez que se han identificado los parámetros críticos éstos pueden ser modificados de manera que el producto mejore, un ejemplo sería el cambio o adición de algún agente criopreservador para aumentar la estabilidad de un producto, definida como 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, ésta es evaluada mediante estudios de estabilidad, los cuales consisten en pruebas que se efectúan a un fármaco o a un medicamento por un tiempo determinado, bajo la influencia de temperatura, humedad o luz en el envase que lo contiene³⁸.

2.9 Criopreservadores

La refrigeración y congelación son, a pesar de ser las más antiguas y comunes, las principales técnicas de conservación donde se incluye la aplicación de temperaturas bajo cero, lo cual inhibe el crecimiento de microorganismos y reduce la velocidad de las reacciones químicas. Ambos métodos hacen posible alargar la vida de anaquel, con la diferencia de que la refrigeración permite una preservación a mediano plazo, mientras que la congelación conserva los productos a largo plazo.³⁸ La desventaja que presenta la congelación es la expansión de agua que genera la formación de cristales de hielo y la estructura celular tiende a destruirse; debido a esto se recomienda un sistema de congelación rápido, que a diferencia del lento donde se generan cristales de hielo grandes, genera cristales pequeños y el daño en la estructura celular es menor, una aplicación de este proceso puede hacerse en liposomas, los cuales poseen estructura semejante a la celular; por lo cual es necesario tomar en cuenta aquella técnica de congelación en la que no se generen cristales grandes, junto con la adición de un agente crioprotector, para evitar que durante un proceso de criopreservación estas vesículas puedan sufrir daños.

La criopreservación puede ser definida, como una serie de técnicas que permiten mantener en buen estado a través del tiempo a las sustancias en condiciones de temperatura baja.

Algunas sustancias con capacidad de actuar como crioprotectores son azúcares (sacarosa, trehalosa), polioles (manitol, sorbitol, inositol), algunas sales, aminoácidos (glutamato) y sustancias proteicas (peptona, leche descremada).

2.10 Propiedad intelectual- Patentes

A lo largo del tiempo la inteligencia del hombre ha dado lugar a diferentes tipos de creaciones, las cuales se protegen de diferentes formas, para que el titular tenga libertad de usar su creación como el desee y para que tenga reconocimiento y remuneración; entre otros.

Los derechos que posee el creador pueden ser objeto de cesión o bien de una licencia a terceros, todo esto siempre y cuando no infrinja la ley.

La propiedad Intelectual deriva en dos ramas principales la propiedad industrial y el derecho de autor. Dentro de la propiedad Industrial se encuentra la protección a través de patentes, la cual es una de las formas más antiguas de protección de la propiedad intelectual, es aquella que protege tanto las nuevas creaciones como las creaciones ya existentes, puede definirse como una nueva solución a un problema técnico.

Las características que debe presentar una invención para que se le pueda otorgar protección mediante patente son:

- Ser nueva o novedosa
- Implicar un elemento inventivo
- Tener una aplicación industrial

En las patentes no es necesario que la invención se encarne físicamente, no obstante existen cosas que no pueden ser patentadas.

Dado que los documentos de patente pueden ser títulos legales de propiedad, aportan una valiosa información sobre las empresas que tienen la tecnología,

sobre los inventores, sobre la duración de la titularidad, la libre disponibilidad de una tecnología cuando la patente haya caducado, entre otros.³⁹

El tiempo de protección por medio del sistema de patentes es de 20 años a partir de la fecha de solicitud de patente, esta protección no es mundial, el inventor debe pagar las tasas de presentación y de mantenimiento a todos los países en los que desee que se proteja su invención.⁴⁰

Cuando alguien quiere invertir en el desarrollo de una invención es necesario que haga una investigación previa para corroborar que nadie más lo haya pensado antes y tenga los derechos. Para esto es necesario realizar el estudio del estado de la técnica o estado del arte, el cual comprende todo lo que se ha puesto a disposición del público en cualquier lugar del mundo, mediante una publicación en forma tangible, la venta o comercialización, el uso o cualquier otro medio, antes de la fecha de presentación de una solicitud de patente o de la reivindicación de la prioridad de un derecho.⁴¹

Hay diversas y fuertes razones para realizar el estudio, las cuales generalmente apuntan a:

- La evaluación del alcance de los derechos; búsqueda de infracciones.
- Asegurar que la invención cubrirá los requisitos para poder ser patentable.
- Poder tener una planificación adecuada de actividades de investigación o comerciales.

Cuadro 3. Elementos constitutivos de las solicitudes de patente⁴²

Elemento	Títulos con subtítulos y contenido del manuscrito
Descripción	<ul style="list-style-type: none"> a) Título de la invención, precisando el campo técnico. b) Antecedentes. Se centra en demostrar el dominio y apropiación del estado de la técnica. c) Descripción de la invención. Debe mostrar el problema técnico que resuelve, dar soluciones al mismo, exponiendo las ventajas y eficiencia de solución mediante la patente, d) Debe mostrar el mejor método de reproducir la invención y deberá compararlo con los anteriores, si los hubiera. e) Ejemplos prácticos de la invención y usos específicos. f) Contiene las tablas y figuras necesarias para explicar y demostrar los usos de la invención, estas deberán ir etiquetadas y explicadas.
Reivindicaciones	<ul style="list-style-type: none"> a) Define las características técnicas de la invención. b) Delimitan la invención c) Deben y pueden referirse compuestos químicos o mezclas definidas por su composición y/o funciones, métodos o procesos específicos. d) Aplicación nueva de un procedimiento conocido o la

Cuadro 3. Elementos constitutivos de las solicitudes de patente

	<p>utilización novedosa de un producto conocido.</p> <p>e) El orden numérico consecutivo, con números arábigos y corresponder a la naturaleza y función de las características de la invención.</p> <p>f) La primera reivindicación deberá referirse a las características esenciales de la invención</p> <p>g) Debe incluir una reivindicación independiente por cada categoría.</p>
Dibujos y tablas	<p>a) Tablas y dibujos/fotografías llevan de forma independiente título e identificados con números.</p> <p>b) Presentación clara, limpia, subtítulos los diferentes componentes.</p>
Resumen	<p>a) El título de resumen</p> <p>b) La extensión mínima de 100 y máxima de 200 palabras.</p> <p>c) Claridad de redacción.</p> <p>d) Deberá concentrarse en la novedad en el campo al que pertenece.</p> <p>e) Deberá abordar por ejemplo; modificaciones de procesos; estructura u organización y operación de aparatos, equipos o maquinarias; manufactura de equipos o artículos diversos; para compuestos químicos deberá detallar metodología, preparación y posibilidad de usos; para procesos industriales incluir las etapas,</p>

Cuadro 3. Elementos constitutivos de las solicitudes de patente	
	tipos de redacción, condiciones; etcétera.
	f) No contendrá declaración de méritos, valor de la invención, ni sobre su aplicación.

Cuadro 4. Etapas del proceso de la solicitud de patente⁴²

Etapas del proceso	Características
Solicitud	<ol style="list-style-type: none"> 1. Formato para seleccionar que tipo de protección se solicita. 2. Este formato contiene el concentrado de información inventor, título de la patente, fecha de divulgación previa y prioridad internacional. 3. Adicionalmente se incluye una copia de: publicación previa, contrato de cesión de derechos, ejemplares de divulgación previa, comprobantes de prioridad, traducciones, acreditación del apoderado legal y constancia de depósito de material biológico. 4. Formato de pago de la tarifa correspondiente³ a registro con sello original del banco.
Examen de forma	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verifica los documentos que integran el expediente (márgenes, numeración, claridad de dibujos, tablas). Se envía un oficio al inventor, podrá requerir precisiones, aclaraciones o subsanar
Cuadro 4. Etapas del proceso de la solicitud de patente.	
	<ol style="list-style-type: none"> 2. Pago de reposición de documentos 3. Duración 18 meses, termina con publicación del resumen en la

	gaceta.
Publicación	<ol style="list-style-type: none"> 1. Objetivo de publicación es informar a la comunidad y recibir oposiciones por infringimientos a otras patentes. 2. Ocurre en proceso normal a los 18 meses de la fecha de solicitud. Art. 52. 3. Adelantada 6-18 meses bajo solicitud del interesado, debe cubrir un pago adicional al hacer la solicitud.
Examen de fondo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Asignación del comité (4 personas especialistas) y presidente de análisis de fondo. 2. El IMPI puede solicitar la ejecución en oficinas extranjeras examinadoras. 3. Condiciones centrales del análisis: a) novedad, b) originalidad, c) actividad inventiva y d) explotación industrial. 4. Implícito se encuentra el no infrigimiento de derechos de otras patentes. 6. Pago de reposición de documentos. Cuando sea solicitado
Emisión de título	<ol style="list-style-type: none"> 2. Pago de emisión de título de derechos 4. Si no cumple con los pagos se declarará abandonada. 5. Expedición del título. 6. Publicación en gaceta.
Publicación	Publicación de la fecha del título y resumen de la patente otorgada en la Gaceta oficial. Art. 60.

Cuadro 4. Etapas del proceso de la solicitud de patente.	
Tiempo estimado IMPI (nacional)	Entre 4.5 y 5.0 años

Notas:

- 1.- Todo lo patentable se describe en artículo 16 LPI.
- 2.- Artículos referentes a la LPI.
- 3.- Consultar el monto vigente, en la ventanilla más cercana o en la página del IMPI.

2.10.1 Patentes en México

Si bien la producción científica en la forma de publicaciones constituye un indicador de calidad para el académico, la producción de patentes tiene un mayor significado en lo que se refiere a la articulación productiva del conocimiento generado.

El número de patentes solicitadas por los residentes de un país a la institución oficial, en nuestro caso el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), que controla los derechos de propiedad industrial, constituye un reflejo de la producción tecnológica, ya que mediante las patentes se evidencia gran parte de

los avances tecnológicos sujetos de explotación comercial, obtenidos por los países a través del tiempo.

Las cifras que para México existen en materia de patentes, presentan indicadores que demuestran que no han sido suficientes los niveles del gasto en IDE (Investigación y Desarrollo Experimental) y los recursos dedicados al desarrollo experimental, específicamente aquellos del sector productivo, ya que la tendencia del número de solicitudes de patentes de residentes ha disminuido considerablemente durante los últimos años.

En 2007 se registraron en nuestro país 16,599 solicitudes de residentes, de las cuales se otorgó registro a 9,957. En ese mismo año las solicitudes y concesiones de patentes de mexicanos fueron de 641 y 199 respectivamente (IMPI, 2008).

Las cantidades absolutas de patentes solicitadas son una buena referencia para conocer la estructura de concreción del conocimiento científico y tecnológico, pero también pueden usarse otros indicadores que contextualicen más la información; lo anterior se logra al interrelacionar la información sobre patentes con, por ejemplo, el número de habitantes, con lo cual generamos el indicador de Ciencia y Tecnología (CyT) denominado coeficiente de inventiva (número de solicitudes de patentes por residentes por cada 10,000 habitantes), o bien cuando se vincula el número de patentes solicitadas en un país por extranjeros o no residentes, con la cantidad de patentes solicitadas por residentes, con lo que se calcula la tasa de dependencia tecnológica (CONACyT, 2007).¹⁴

3. Planteamiento del problema

De acuerdo a la Academia Mexicana de Ciencias, la biotecnología es una multidisciplinaria cuyo sustento es el conocimiento generado en diversas disciplinas que permiten el estudio integral, la modificación y la utilización de los seres vivos del planeta⁴³ para la obtención de algún producto en específico, como lo es la IL-2, la cual es utilizada en el tratamiento contra el cáncer como modificador de la respuesta inmune, sin embargo al ser administrada vía intravenosa, ésta tiene severos efectos secundarios sobre el paciente.

En la actualidad hay diferentes tratamientos para el cáncer metastásico, dentro de los principales se encuentra la quimioterapia la cual inhibe la división de células, entre las que se encuentran las tumorales, desafortunadamente también afecta a las normales. Debido a la destrucción indiscriminada de células por los agentes quimioterapéuticos y los diferentes efectos secundarios en el organismo tras su administración, se han desarrollado diferentes y novedosos métodos en los cuales las investigaciones indican que es mejor hacerlo de manera indirecta enviando los agentes quimioterapéuticos a blancos moleculares sobreexpresados en la superficie de las células tumorales usando nanoacarreadores para terapia pasiva del cáncer, tales como los liposomas. Por otra parte, estos nanoacarreadores pueden llevar más cantidad de agente terapéutico, incrementan su vida media, solubilidad y reducen su eliminación renal.⁴⁴

Como alternativa terapéutica desde hace algunos años se ha trabajado en un sistema nanoacarreador de tipo lipídico (liposomas) el cual contiene y/o expresa

en su superficie IL-2, posee actividad inmunorreguladora y antitumoral descrito en la Patente Mexicana 330174; este sistema al ser administrado vía intraperitoneal reduce los efectos secundarios que la IL-2 produce al ser administrada vía intravenosa.

Sin embargo el medicamento preparado tal como se describe en la patente ya mencionada presenta la desventaja de no ser estable más allá de dos meses, debido a que la IL-2 pierde su actividad.

Por lo anterior, en el presente trabajo se optimiza el sistema mediante criopreservación y además se presenta la solicitud de patente de proceso respectiva.

4. Objetivo General

Desarrollar un proceso de estabilización mediante la adición de un criopreservador a una composición farmacéutica liposomal que contiene IL-2 y redactar la solicitud de patente correspondiente.

4.1 Objetivos específicos

- Calificar el congelador marca NIETO y determinar la temperatura de cada nivel.
- Seleccionar el criopreservador y concentración para la composición farmacéutica de liposomas que contienen IL-2.
- Determinar la estabilidad física y biológica del sistema nanoacarreador-citocina durante 12 meses.
- Elaborar un estudio del estado de la técnica
- Redactar una solicitud de patente.

5. Hipótesis

Ya que los nanoacarreadores lipídicos al momento de encapsular al agente terapéutico también encapsulan al medio, en este caso agua, la cual durante el proceso de congelación forma cristales en el interior del nanoacarreador, provocando su ruptura; la adición de un agente criopreservador que proteja a la partículas y minimice la formación de cristales aumentará el tiempo de vida útil del sistema nanoacarreador-citocina.

6. Diseño experimental

Tipo de estudio: Experimental controlado

Forma de recolección de información: Prospectivo.

Secuencia temporal del estudio: Longitudinal

Cantidad de poblaciones: Comparativo

Actitud del investigador: Experimental

Población de estudio: Liposomas con IL-2

Criterios de inclusión: Liposomas unilamelares que contienen IL-2 activa.

Criterios de exclusión: Muestra contaminada.

Criterios de eliminación: Fallas en el equipo, muestras fuera de tiempo

Variables:

Dependientes:

Rugosidad, complejidad e integridad del liposoma

Contenido y expresión de IL-2

Independientes:

Agente criopreservador y concentración del mismo

7. Material y métodos

Material y equipo

- Balanza analítica Denver Instrument
- Placa de agitación y calentamiento
- Potenciómetro, Denver instrument UV-10, Ultra basic.
- Lector de ELISA ELx800
- Microscopio electrónico JEOL
- Citómetro de flujo FACSARIA 2 BECTON DICKINSON.
- Ultracentrífuga Modelo BeackMan INV 1272811
- Rotor SW40-1, Camisas Número de Serie L92L831
- Congelador marca Nieto
- Campana de flujo laminar.
- Equipo de cómputo
- Alambre Termopar
- Data loggers
- Tanque de Nitrógeno
- Bomba para vacío
- Pipetas dosificadoras Eppendorf y aditamentos.
- Placas de ELISA SarsteadCatalogo 82.1581
- Vaso de precipitados de 50 mL.
- Tubos de ensayo estériles 13X100 Pyrex
- Matraz Erlenmeyer
- Embudo büchner

- Vasos de precipitado (diferentes medidas)
- Pipeta graduada 1 mL
- Pipetas Pasteur
- Varilla de vidrio.
- Tubo cónico de 50 mL marca Corning.
- Tubo para citómetro
- Viales de 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL y 2 mL marca Eppendorf
- Filtros de 0,22 micras marca Millipore
- Frascos color ámbar de diferentes volúmenes
- Mangueras
- Caucho
- Tapones de caucho
- Papel Parafilm
- Barra magnética.
- Gasas
- Papel aluminio
- Papel Kraft
- Gradillas de diferentes tamaños
- Propipeta
- Jeringas de plástico estériles (diferentes medidas)

Metodología

1. Calificación del congelador.

- a) Inspección visual de las condiciones del congelador:
 - Inspección de la instalación de acuerdo al manual del fabricante.
- b) Test de distribución de temperatura: Vacío y lleno.

2. Síntesis de espermidil-colesterol.

- a) Esta consiste en una solución en cloroformo de espermidina base la cual es adicionada a una solución en cloroformo de colesteril cloroformato.

3. Fabricación de liposomas vacíos.

- a) Pesar el espermidil-colesterol.
- b) Agregar la fosfatidilcolina.
- c) Agregar cloroformo a la mezcla de lípidos hasta observar una solución.
- d) Secar el disolvente mediante una corriente de nitrógeno.
- e) Agregar solución buffer de fosfatos (PBS).
- f) Sonicar.
- g) Resuspender en PBS.
- h) Separar el producto en ocho partes iguales.
- i) Resuspender las porciones obtenidas en las siguientes soluciones:
 - Trehalosa: 5%, 7%, 10% en PBS.
 - Trehalosa-Glicerol: 7%-2%, 7%-1.5%, 7%-1%, 7%-0.5% en PBS.
 - Glicerol: 2% en PBS.

- j) Colocar en el congelador a -20°C .
- k) Llevar a cabo evaluación inicial y semanal que consiste en: citometría de flujo, microscopía electrónica y ELISA (del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).
- l) Determinar compatibilidad y seleccionar la o las muestras que serán evaluadas para estabilidad.

4. Fabricación de liposomas con IL-2.

- a) Pesar el esperimidil-colesterol.
- b) Agregar la fofatidilcolina.
- c) Agregar cloroformo a la mezcla de lípidos hasta observar una solución.
- d) Secar el disolvente mediante una corriente de nitrógeno.
- e) Agregar solución stock de interleucina 2 (IL-2).
- f) Agregar solución buffer de fosfatos (PBS).
- g) Sonicar.
- h) Ultracentrifugar durante 40 minutos.

5. Uso de soluciones de criopreservador seleccionadas.

- a) Resuspender en diferentes mezclas de criopreservador.
- b) Separar el producto en viales.
- c) Colocar en el congelador a -20°C .
- d) Llevar a cabo evaluación inicial y mensual que consiste en: citometría de flujo, microscopía electrónica y ELISA.

- Microscopía electrónica: Evaluará la morfología de los liposomas por tinción negativa. Se colocarán 5 microlitros de una disolución del sistema y se colocan en rejillas recubiertas de Formvar. Después de cinco minutos se seca con papel absorbente y se le agrega acetato de uranilo por cinco minutos, se seca y se observa al microscopio electrónico.
- Citometría de flujo: Evaluará tamaño y complejidad relativos de los liposomas que conforman el sistema. Se colocan disoluciones de éste en el citómetro y se evalúa FSC (Tamaño), SSC (Complejidad) y un mapa de puntos que indique la relación entre los dos parámetros para establecer un área donde se encuentra la población inicial.
- ELISA: Evaluará la cantidad de IL-2 que posee actividad biológica. Esta determinación se llevó a cabo conforme al PNO: LOCE121012 “Procedimiento maestro para la cuantificación de IL-2 contenida en un sistema nanoacarreador”; brevemente, se coloca en cada pozo el anticuerpo de captura MAB-602, luego es bloqueado con una solución de polivinilpirrolidona (PVP), se colocan ya sea estándares para la curva correspondiente o muestras del sistema lisado con tritón, se añade el anticuerpo biotinilado BAF-202, estreptavidina y una solución stock de 3,3-5,5-tetrametilbenzida. Una vez llevada a cabo la reacción las placas se evalúan en un lector a 450 nm.

6. Redacción de la solicitud de patente

Para la elaboración de la solicitud de patente se inicia con el estudio del estado de la técnica, el cual abarca:

- a) Clasificación de la invención.
- b) Investigación exhaustiva de no invasión en bases de datos de patentes mundiales.
- c) Información bibliográfica “no patentes”.
- d) Descripción detallada de cada uno de los materiales utilizados.
- e) Evaluación de cumplimientos para patentar.
- f) Actualización tecnológica.

Con base en el estado de la técnica se redactó la patente la cual incluye de manera detallada la invención, destacando los puntos a proteger, resumen de no invasión, título, autores y apoderados. Cabe destacar que la patente no es incluida dentro de este trabajo, por motivos de confidencialidad mientras ésta es aceptada, se anexa la carátula de la solicitud de patente.

En el siguiente diagrama de flujo se sintetiza el desarrollo experimental del presente trabajo.

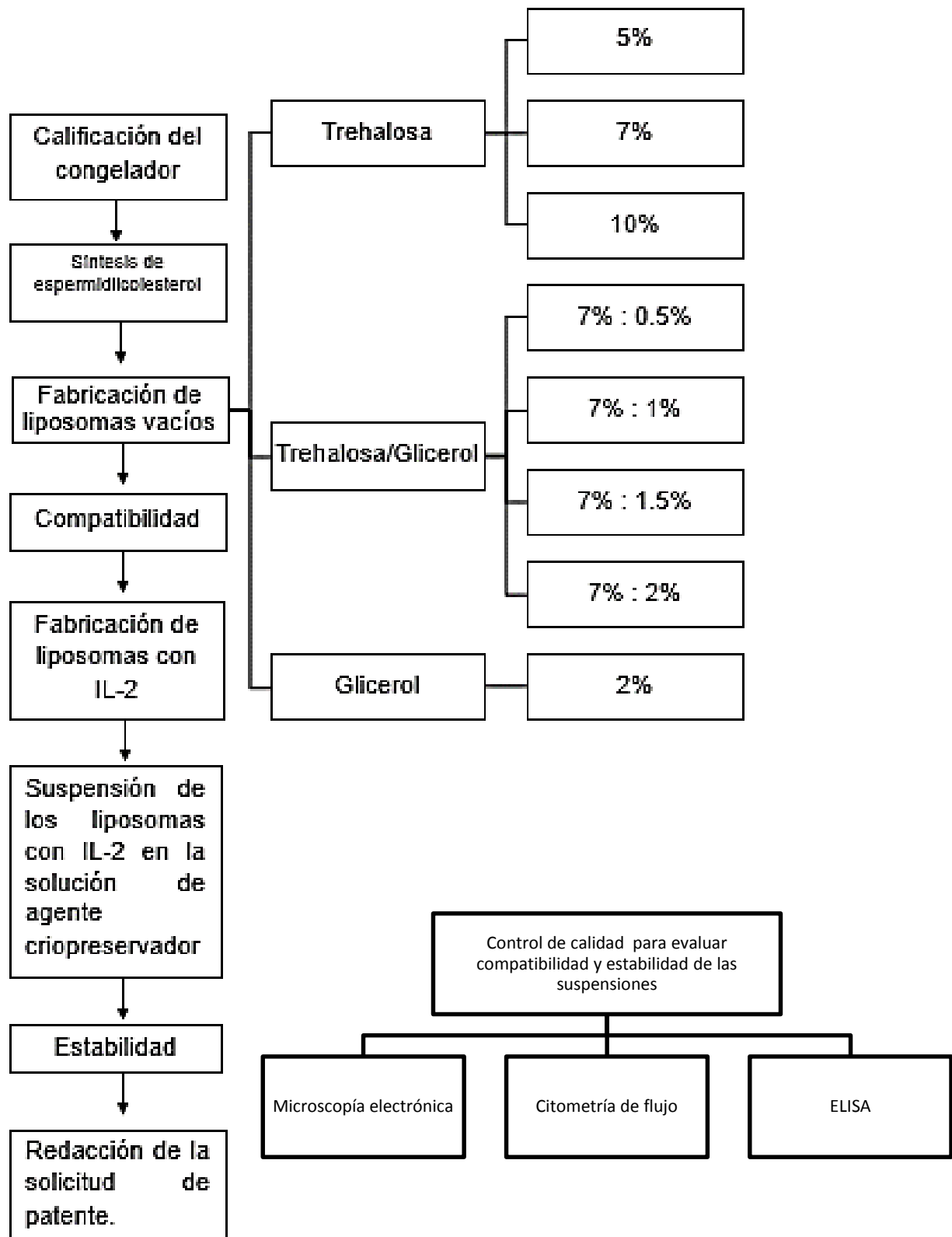


Figura 4. Desarrollo experimental.

8. Resultados

8.1 Calificación del congelador

Con la finalidad de asegurar que el congelador utilizado marca Nieto cumple con la especificaciones para las que será usado (-13°C a -22°C), se utilizó el programa Data Recorder, el cual analizó datos obtenidos de un monitoreo continuo por 48 horas mediante el uso de Datta loggers, colocados de manera estratégica en el congelador (Tablas 1 y 2). Los resultados indicaron que existen variaciones dependiendo el nivel y la zona, sin embargo, todas las temperaturas cumplen con las especificaciones del congelador:

-12.69°C a	-16.47°C b	-13.43°C c	Nivel 4
-14.95°C a	-17.48°C b	-14.13°C c	Nivel 3
-14.71°C a	-13.2°C b	-14.84°C c	Nivel 2
-13.43°C a	-15.56°C b	-16.01°C c	Nivel 1

Tabla 1. Temperaturas del refrigerador marca Nieto sin carga.

-14.95°C a	-19.31°C b	-16.21°C c	Nivel 4
-18.59°C a	-21.92°C b	-20.46°C c	Nivel 3
-20.57°C a	-13°C b	-20.63°C c	Nivel 2
-18.26°C a	-22.53°C b	-20.60°C c	Nivel 1

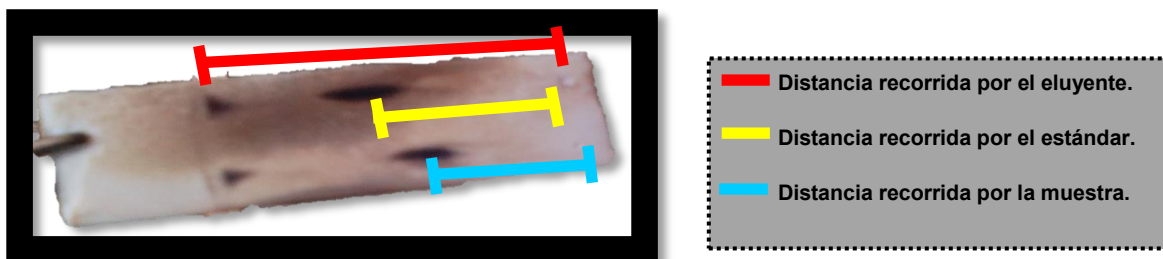
Tabla 2. Temperaturas del refrigerador marca Nieto con carga.

Una vez hecho el monitoreo de las temperaturas y el análisis de datos se establece como CONFORME para poder llevar a cabo el estudio correspondiente.

8.2 Síntesis de espermidil colesterol

La síntesis del espermidil-colesterol se llevó a cabo dado que no hay una empresa que se dedique a la fabricación y venta de este compuesto y es un lípido importante en la fabricación de los liposomas: La síntesis se desarrolló en el laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ, donde se establecieron modificaciones del proceso que lleva a cabo el Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández en la ENCB del IPN, susceptibles a solicitud de patente.

El compuesto obtenido del proceso de síntesis fue comparado con el de un estándar de referencia; físicamente tienen el mismo aspecto y aroma, al determinarse el factor de retención (R_f), la diferencia es mínima y debida quizá a la forma en que se colocó la muestra, los resultados indican que se trata del mismo compuesto.



$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida desde el punto de aplicación de la muestra hasta el centro de la marca dejada por esta}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente desde el punto de aplicación hasta el frente.}}$$

$$R_f \text{ estándar} = 0.49$$

$$R_f \text{ muestra} = 0.47$$

8.3 Resultados de compatibilidad con los crioprotectores sugeridos.

De las ocho posibles combinaciones de agentes criopreservadores (Tabla 3), sólo dos se mostraron compatibles, una de ellas más que la otra, ésta última fue sometida a un estudio de estabilidad por 12 meses, los resultados de este estudio indican que el sistema del nanoacarreador catiónico con la mejor combinación de agentes criopreservadores es estable durante un período de 12 meses.

Tabla 3. Combinaciones de criopreservadores propuestas para el estudio.

%	Trehalosa	10.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	5.0	0
	Glicerol	0	0	0.5	1.0	1.5	2.0	0	2.0

8.4 Resultado de la Microscopía electrónica de transmisión.

Para evaluar la morfología e integridad de los liposomas se hizo uso de la microscopía electrónica de transmisión.

Durante los estudios de compatibilidad con las diferentes mezclas de crioprotectores se utilizaron liposomas vacíos (FIG. 1 y 2), al final de estos estudios se seleccionaron las dos mezclas que se mostraron compatibles, sin embargo, fue notable que una es más compatible que la otra y fue ésta la que se

fabricó con IL-2 para la evaluación de la estabilidad a doce meses. La evaluación inicial de las nanovesículas que conforman el sistema mostró buen estado, forma y tamaño (FIG. 3, 4 y 5), y posteriormente durante el estudio de estabilidad las micrografías muestran que no hay cambios en la morfología y tamaño del sistema (FIG. 6).

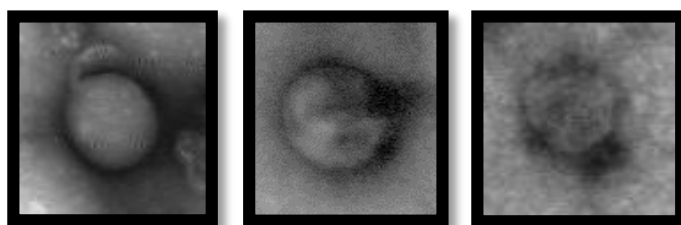


FIG. 1. Micrografías de liposomas. Las tres imágenes son de la misma muestra de liposomas fabricados con el lípido sintetizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ en la FES-Zaragoza, UNAM.

Técnica de tinción negativa, lectura por microscopía electrónica de transmisión, 80 K.

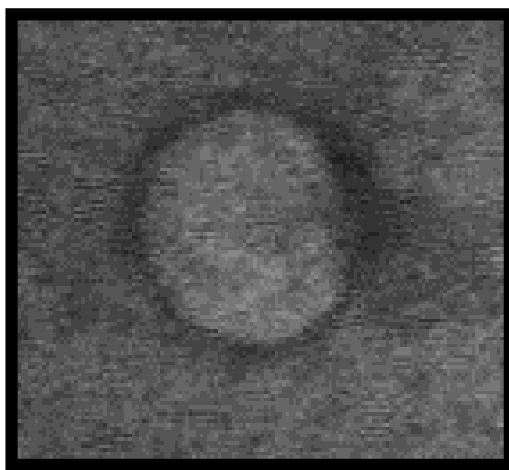


FIG. 2. Micrografía de nanoacarreador catiónico vacío. Liposoma fabricado sin IL-2 para determinar su compatibilidad con diferentes mezclas de criopreservadores.

Técnica de tinción negativa, lectura por microscopía electrónica de transmisión, 100 K.

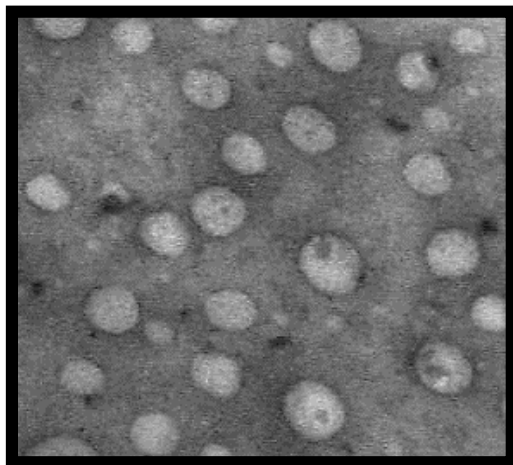


FIG. 3. Población de liposomas catiónicos vacíos. Sistema nanoacarreador sin IL-2 que ha sido sometido a criopreservación con una mezcla de dos agentes crioprotectores, y posterior proceso de descongelación.

Técnica de tinción negativa, lectura por microscopía electrónica de transmisión, 80 K.

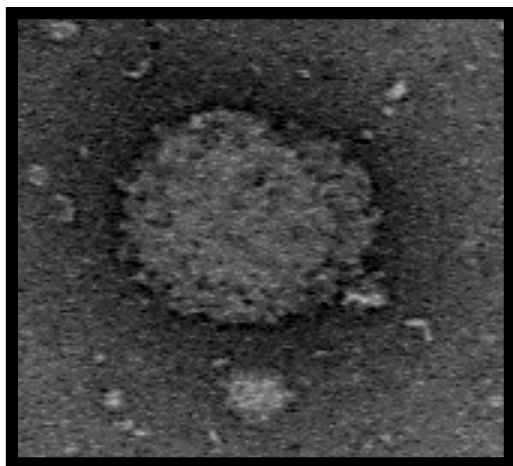


FIG. 4. Micrografía de nanoacarreador catiónico con IL-2. Liposoma que contiene y/o expresa en la superficie IL-2.

Técnica de tinción negativa, lectura por microscopía electrónica de transmisión, 80 K.

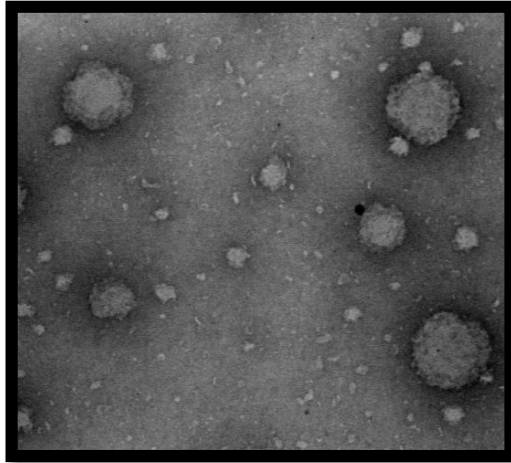


FIG. 5. Población inicial de liposomas catiónicos con IL-2. Se encuentran en una mezcla de dos agentes crioprotectores y posterior proceso de descongelación.

Técnica de tinción negativa, lectura por microscopía electrónica de transmisión, 80 K.

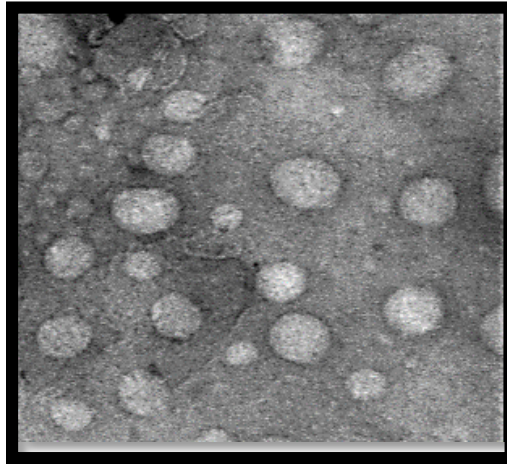


FIG. 6. Sistema nanoacarreador liposomal catiónico final. Evaluación del sistema liposomal en la mezcla de agentes crioprotectores una vez transcurridos 12 meses.

Técnica de tinción negativa, lectura por microscopía electrónica de transmisión, 80 K.

8.5 Resultados de la citometría de flujo

Para la evaluación del tamaño, complejidad y cantidad de nanopartículas se utilizó citometría de flujo. La población inicial del sistema nanoacarreador se muestra en histogramas, evaluando el tamaño (FSC-A) (FIG. 7A), y complejidad (SSC-A) (FIG. 7B), en una población de nanoacarreadores catiónicos que contienen IL-2 y se encuentran suspendidos en una mezcla de agentes criopreservadores.

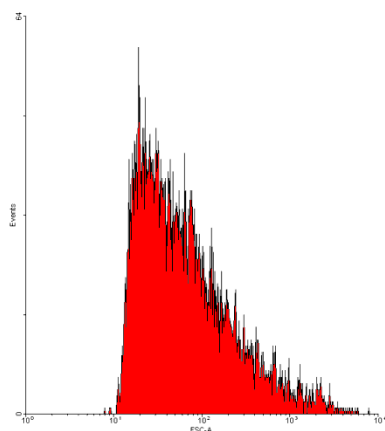


FIG.7A

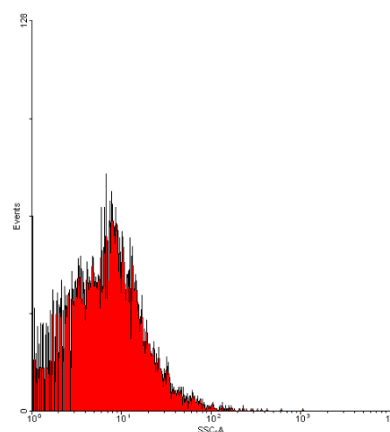


FIG.7B

FIG. 7. Histogramas iniciales del sistema nanoacarreador liposomal. Evaluación inicial del sistema liposomal en la mezcla de agentes crioprotectores mediante citometría de flujo. A) Tamaño relativo contra número de eventos y B) Complejidad relativa contra número de eventos.

Los histogramas iniciales se usaron como referencia durante el estudio. Cada mes se descongelaron los viales correspondientes y se les realizó la misma evaluación mediante citometría de flujo, los resultados obtenidos a lo largo del estudio fueron sobrepuestos a los iniciales para determinar si había diferencia entre una población y otra.

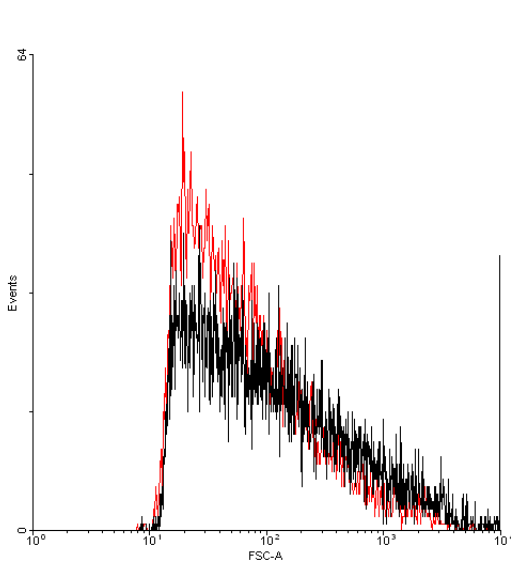


FIG.8A

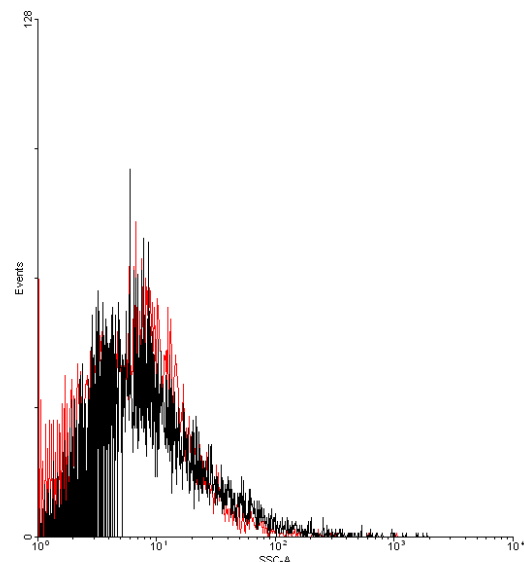


FIG.8B

FIG. 8. Sobreposición de histogramas finales del sistema nanoacarreador liposomal. Evaluación final en el mes doce del sistema liposomal en la mezcla de agentes crioprotectores mediante citometría de flujo. A) Tamaño relativo contra número de eventos y B) Complejidad relativa contra número de eventos. El contorno del histograma inicial se muestra en rojo y el del final en negro.

Los resultados finales indican que no hubo diferencia significativa de los histogramas finales obtenidos en el mes doce, como se puede observar en la comparación de poblaciones por sobreposición de histogramas, (FIG. 8 A y B).

Adicionalmente, el software asociado al citómetro indica el porcentaje de eventos, en este caso nanopartículas, que se conserva cada mes respecto a la población inicial con cuyos datos se elaboró una gráfica del porcentaje de conservación mensual (FIG. 9). El porcentaje máximo de partículas que salió de los parámetros de la población inicial fue del 12% a lo largo de 12 meses.

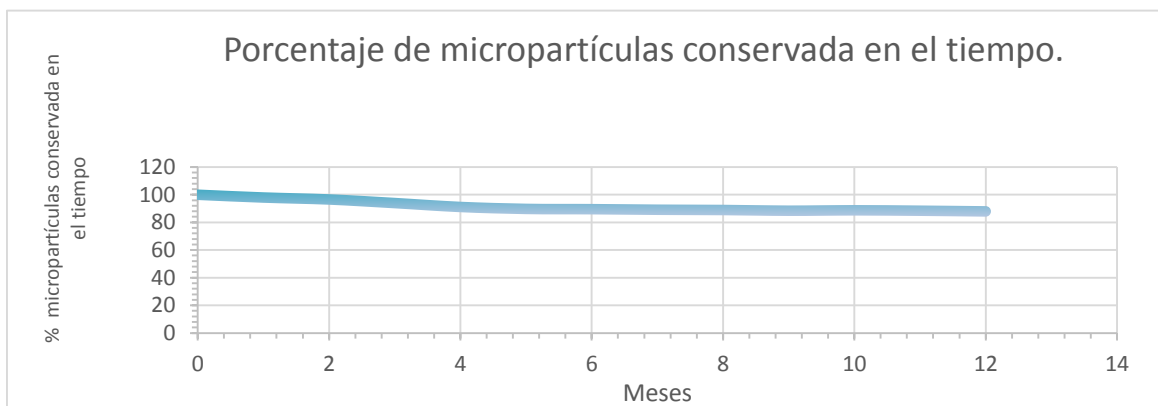


FIG. 9. Porcentaje de nanopartículas conservadas en el tiempo. Se presentan los porcentajes conservados mensualmente hasta el fin del estudio en el mes doce, según la evaluación relativa por citometría de flujo.

8.6 Resultado de la evaluación de la actividad biológica de IL-2 mediante técnica de ELISA

Una vez evaluada la morfología y cantidad de las nanopartículas se procedió a cuantificar la concentración de IL-2 total, la cual involucra la expresada en la membrana y la encapsulada en la vesícula.

Esta determinación se llevó a cabo mediante ELISA, conforme al PNO: LOCE121012 “Procedimiento maestro para la cuantificación de IL-2 contenida en un sistema nanoacarreador”, mencionado en la sección metodología.

Los resultados indicaron que la actividad inicial de la interleucina 2 fue de 95.78 UI y la final de 75.69 UI, por lo que la disminución de la interleucina 2 fue de 20.09 UI a lo largo de 12 meses.

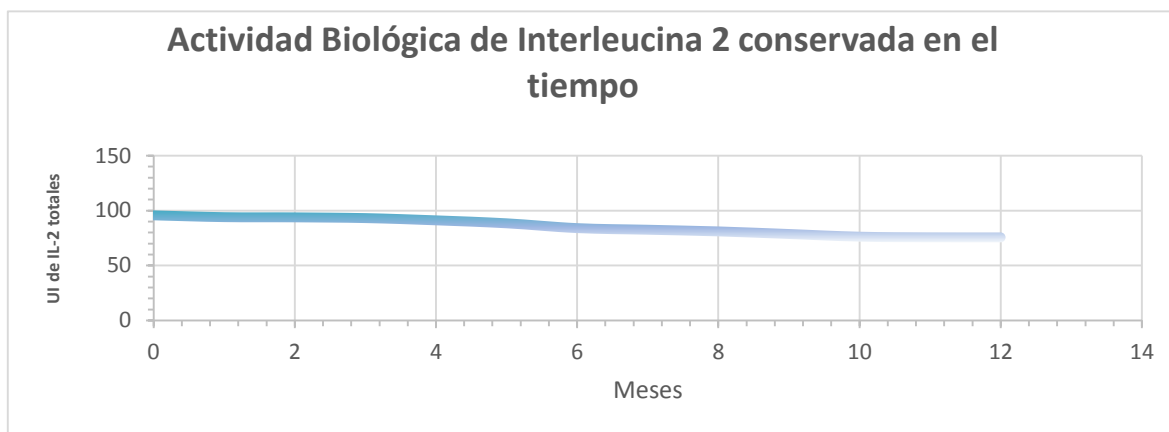


FIG. 10. Actividad Biológica de Interleucina 2. Se realizó la cuantificación de la IL-2 total mes a mes durante doce meses del estudio mediante la técnica de ELISA.

8.7 Elaboración de la solicitud de patente ante el IMPI

Una vez obtenidos los datos de la estabilidad se procedió a elaborar el estado del estudio de la técnica y la patente correspondiente, la cual fue presentada por la oficina de vinculación de la UNAM ante el IMPI, con lo cual una vez concedida se podrá dar mayor protección a la patente mexicana 330174. Cabe destacar que hasta que sea aceptada, por motivos de confidencial no puede ser incluida en este trabajo.

La base del desarrollo de la patente es el estudio del estado de la técnica la cual cuenta básicamente con lo siguiente:

Clasificación de la invención, puntos a proteger, investigación exhaustiva de no invasión en bases de datos de patentes, revistas, libros y un estudio de mercado.

Tabla 6. Bases de datos utilizadas.

SIGA-IMPI	Orange Book-FDA
USPTO-USA	Registros Sanitarios- COFEPRIS
ESPACENET	EISEVIER
SIPO	Scientific.net
WIPO	ABC-Chemistry, Researcher's guide to journals.
REDALyC	SciELO

En esta además se detalla combinación de palabras para buscar, materiales a utilizar, procedimiento.

8.7.1 Datos de la solicitud de patente.

Título de la invención: “Proceso de Estabilización mediante criopreservación de una composición farmacéutica liposomal que contiene Interleucina 2, y el producto obtenido con el mismo”

Expediente: MX/a/2015/013539

Folio: MX/E2015/0609055

Nombre de los inventores: María Teresa Corona Ortega, Ramón Soto Vázquez, Benny Weiss Steider, Rosalva Rangel Corona

Nombre del apoderado: Martha Figueroa Pérez

A continuación imagen de la carátula de la solicitud de patente:



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
 Dirección Divisional de Patentes

<input checked="" type="checkbox"/>	Solicitud de Patente
<input type="checkbox"/>	Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad
<input type="checkbox"/>	Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
<input type="checkbox"/>	Modelo Industrial
<input type="checkbox"/>	Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI
Sello
Folio de entrada
Fecha y hora de recepción

Solicitud: MX/a/2015/013539
 Expediente: 23/SEP/2015 Hora: 11:19:14
 Fecha: MX/E/2015/000005 252375


Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/>	El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/>
1) Nombre (s): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO	
2) Nacionalidad (es): MEXICANA	
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: 9° PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510	
Población, Estado y País: COYOACÁN, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO.	
4) Teléfono (clave): (55) 56 22 63 29 AL 31	5) Fax (clave): (55) 56 65 46 44

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
6) Nombre (s): MARÍA TERESA CORONA ORTEGA, RAMÓN SOTO VÁZQUEZ, BENNY WEISS STEIDER Y ROSALVA RANGEL CORONA.	
7) Nacionalidad (es): MEXICANAS.	
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: CALLE VÍCTOR HUGO, NO. 12 - 401, PORTALES ORIENTE, C.P. 03570.	
Población, Estado y País: BENITO JUÁREZ, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO.	
9) Teléfono (clave):	10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)	
11) Nombre (s): MARTHA FIGUEROA PÉREZ	12) RGP-DDAJ-14782
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: 3er PISO DEL EDIFICIO "B" DE LAS OFICINAS ADMINISTRATIVAS EXTERIORES DE LA ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510.	
Población, Estado y País: COYOACÁN, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO. 1) Teléfono (clave): (55) 56 22 63 29 15) Fax (clave): (55) 56 65 46 44	
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: JESÚS GARCÍA MONCADA, ROCIO JUÁREZ VÁZQUEZ y MIGUEL ÁNGEL NIEVES MARTÍNEZ.	

17) Denominación o Título de la Invención: "PROCESO DE ESTABILIZACIÓN MEDIANTE CRIOPRESERVACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA LIPOSOMAL QUE CONTIENE INTERLEUCINA 2, Y EL PRODUCTO OBTENIDO CON EL MISMO"	
---	--

18) Fecha de divulgación previa Día Mes Año	19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI
20) Divisional de la solicitud Número	21) Fecha de presentación Día Mes Año
22) Prioridad Reclamada: País Fecha de presentación (Día Mes Año) No. de serie	

Lista de verificación (uso interno)			
No. Hojas		No. Hojas	
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 4	Documento de cesión de derechos
<input checked="" type="checkbox"/> 24	Descripción y reivindicación (es) de la invención		Constancia de depósito de material biológico
<input checked="" type="checkbox"/> 4	Dibujo (s) en su caso		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Documento que acredita la personalidad del apoderado		Traducción
			TOTAL DE HOJAS
			35

Observaciones:
 Se anexa hoja de descuento

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ C.D. UNIVERSITARIA, D.F. A 21 DE SEPTIEMBRE DE 2015
 Nombre y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
EN DIFERENCIACIÓN CELULAR
Y CÁNCER. LABORATORIO DE
ONCOLOGÍA CELULAR.

México, D.F., a 24 de septiembre de 2015.

PAS. DE Q.F.B. LETICIA XAHUANTITLA SALGADO
P R E S E N T E :

Por este conducto me dirijo a usted para agradecerle su apoyo en la redacción de la solicitud de patente "PROCESO DE ESTABILIZACIÓN MEDIANTE CRIOPRESERVACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA LIPOSOMAL QUE CONTIENE INTERLEUCINA 2, Y EL PRODUCTO OBTENIDO CON EL MISMO", con número de expediente MX/e/2015/013539. Su participación en la búsqueda del estado del arte y en algunos experimentos que aportan evidencias de la novedad y originalidad fue de valiosa ayuda para la redacción de la patente mencionada.

Sin más por el momento y agradeciéndole una vez más su apoyo, quedo de usted.

ATENTAMENTE



DRA. MARIA TERESA CORONA ORTEGA
INVENTORA

9. Discusión

La obtención de la evidencia documentada de que el congelador opera consistentemente de acuerdo a las especificaciones establecidas es de suma importancia, dado que se pueden obtener datos necesarios para decidir si el equipo es adecuado o debe haber algún cambio. De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo dictaminar como conforme al congelador marca Nieto para así poder llevar en éste el estudio de compatibilidad y estabilidad de la suspensión de un nanoacarreador catiónico liposomal que contiene IL-2 en una mezcla adecuada de agentes criopreservadores. Los resultados indican que el refrigerador lleno y vacío se encuentra dentro del rango para el estudio; sin embargo, se utilizaron las posiciones donde hay menor variación térmica y que la temperatura fue de -20°C , que son 1b y 1c por ser las condiciones establecidas previamente para la ejecución del estudio.

La síntesis del espermidil-colesterol se llevó a cabo dado que no hay una empresa que se dedique a la fabricación y venta de este compuesto y es la base de la fabricación de los liposomas, ésta se desarrolló en el laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ en la FES- Zaragoza con modificaciones al proceso de síntesis que lleva a cabo el Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández en la ENCB del IPN, el resultado fue comparado con el de un estándar de referencia, la cromatografía mostraba similitud en cuanto a la marca y factor de retención (R_f) en el cual hubo una diferencia en el coeficiente de 0.02, lo cual se atribuye a la forma de colocar la muestra en la placa, de la misma manera el lípido que se obtuvo físicamente tenía la misma consistencia, color y olor que el

estándar, otra prueba de que el lípido es el esperado fue la formación de liposomas haciendo uso de éste.

La fabricación de los liposomas es llevada a cabo conforme a la patente mexicana 330174 “Composición liposómica de IL-2 y su uso en el tratamiento de cáncer cérvico uterino”, los autores son Rosalva Rangel Corona, María Teresa Corona Ortega, Benny Weiss Steider, Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández, Isabel Baeza Ramírez. Una vez fabricados los liposomas vacíos se suspendieron en las soluciones de mezclas de agentes crioprotectores durante una semana, las evaluaciones en seis de las ocho mezclas mostraban a través de la microscopía electrónica que los liposomas habían sufrido colapso, dejando sólo residuos del nanoacarreador y la citometría de flujo que la cantidad de micropartículas era de menos del 10% comparado con la inicial, estos resultados permitieron eliminar a estos seis ensayos, los dos restantes se mostraban íntegros, sin embargo se usó para el estudio de estabilidad aquella que tuvo menos variaciones.

Una vez seleccionada la mejor mezcla de agentes crioprotectores, se fabricaron los liposomas catiónicos con IL-2, los liposomas se suspendieron en la solución de agentes crioprotectores y se sometieron a un estudio de estabilidad bajo la influencia de temperaturas bajo cero, se evaluó mensualmente durante 12 meses durante los cuales tuvo una disminución total del 20.09% de actividad de IL-2 y del 12% en cantidad de micropartículas, en las imágenes del inicio del estudio los liposomas se ven con circunferencia delimitada y tamaño homogéneo, en las imágenes de fin de estudio éstos se ven con circunferencia delimitada, ligeramente más pequeños, de tamaño homogéneo.

El estudio de la actividad biológica de la IL-2 contenida y/o expuesta en el sistema indica que al final del estudio posee una actividad mayor a 75 UI/mL, lo que indica que supera la cantidad mínima especificada en la patente concedida que es de 60 UI de IL-2 /mL y 75 % de micropartículas, por lo que podemos considerar que nuestro sistema es estable al menos 12 meses en congelación.

Una vez obtenidos los datos de compatibilidad y estabilidad se elaboró el estudio del estado de la técnica, que fue una parte de suma importancia pues nos permite determinar si el proceso puede ser patentado, al realizar el estudio se determinó que era patentable el proceso y se procedió a redactar la patente que fue presentada al IMPI por el departamento de vinculación de la UNAM con número de expediente MX/a/2015/013539 el 23 de septiembre del 2015, mientras ésta es concedida, por motivos de confidencialidad no es posible anexarla a éste trabajo, se ha anexado la carátula de solicitud de patente; cabe mencionar que si se concede la patente del proceso de criopreservación no sólo es un avance para la posible comercialización del sistema nanoacarreador con IL-2, sino que la concesión aumentaría años de protección a la invención inicial.

10. Conclusiones

- Se Calificó el congelador marca Nieto y se determinaron las temperaturas de cada nivel.
- Se estableció la mejor ruta de síntesis del espermidil-colesterol con el cual se fabricaron los liposomas.
- Se seleccionó la mejor mezcla de agentes criopreservadores la cual fue utilizada para el estudio de estabilidad.
- El proceso de estabilización se estableció de acuerdo al estudio de estabilidad desarrollado:

Elaboración de la solución de agentes criopreservadores en el cual se suspenden los liposomas catiónicos que contienen IL-2 y se almacena a temperatura de -20°C por 12 meses.
- Se determinó la estabilidad física y biológica del sistema nanoacarreador-citocina durante 12 meses.
- Se elaboró el estudio del estado de la técnica.
- Se redactó la solicitud de la patente *“Proceso de Estabilización mediante criopreservación de una composición farmacéutica liposomal que contiene Interleucina 2, y el producto obtenido con el mismo”*, el expediente es *MX/a/2015/013539*, folio *MX/E2015/0609055*.

11. Referencias

^{1,2}Boticario C, Cascales M. Innovaciones en cáncer. Madrid: UNED; 2012.

³ National Cancer Institute [homepage on the internet]. USA: Department of Health and Human Services; c2015 [Updated 2015 February 9; cited 2015 Aug 15]. What Is Cancer?; [about 2 screens]. Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>.

⁴ Organización Mundial de la Salud: OMS [sed web]. Ginebra; c2015 [cited 2015 Aug 15]. Cáncer; [cerca de 7 pantallas]. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/es/>

⁵ American Cancer Society. Datos y Estadísticas sobre el cáncer entre los hispanos/latinos, 2012-2014. Atlanta, Georgia; 2012 [consultado 2015 agosto 15]. Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036792.pdf>

⁶ Gobierno del Estado de México. Instituto de Salud del Estado de México [sede web]. México: Secretaría de Salud; c2012 [actualizado 2015 agosto 20; citado 2015 agosto 21]. Disponible en: <http://salud.edomexico.gob.mx/html/article.php?sid=1011>.

⁷ Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Parkin D. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010

⁸ Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. Aug 31 2006;24 Suppl 3:S3/11-25.

⁹ Saslow DS, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *CA Cancer J Clin*. 2012;64(5)

¹⁰ Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*. Aug 2010;11(8):781-789.

¹¹ Gillison ML, Chaturvedi AK, Lowy DR. HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer*. Nov 15 2008; 113(10 Suppl):3036-3046.

¹² Gobierno del Estado de México. Instituto de Salud del Estado de México [sede web]. México: Secretaría de Salud; c2012 [actualizado 2015 agosto 20; citado 2015 agosto 21]. Disponible en: <http://salud.edomexico.gob.mx/html/article.php?sid=1011>.

¹³ Morris, M.S. 1989. Historia de la biotecnología. *Ciencia y desarrollo*. XIV(84):19-32.

¹⁴ Trejo S. La Biotecnología en México: Situación de la Biotecnología en el Mundo y Situación de la Biotecnología en el México y su Factibilidad de Desarrollo. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del IPN. 2010. Consultado 9 de septiembre de 2014]. Disponible en:

http://www.gbcbiotech.com/en/imagenes/biotecnologia/33BioTecnologia_mexico.pdf

¹⁵Pérez G, Quiroga G. Industria Farmacéutica. México, D.F.: Secretaría de Economía, Unidad de Inteligencia de Negocios, ProMexico; 2013. Disponible en: http://mim.promexico.gob.mx/work/sites/mim/resources/LocalContent/368/2/130820_DS_Farmaceutica_ESP.pdf

¹⁶ Morris, M. S. 1989. Historia de la biotecnología. Ciencia y desarrollo. XIV (84): 20.

¹⁷ Corona C. Ma. Del C. Historia de la biotecnología y sus aplicaciones [Consultado: 8 -sep-2014] [en línea]. Disponible en: http://siladin.cch-orientе.unam.mx/coord_area_cienc_exp/biologia/GuiaBiol/ANEXO_5Ing.pdf.

¹⁸ Gil A, Ruiz L. Tratado de nutrición. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. 2ª ed. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 2010.

¹⁹ Guzmán A., Toledo A. Las Nanotecnologías: un paradigma tecnológico emergente. Dinámica y especialización de la innovación en las nanotecnologías. Razón y palabra [revista en línea]. REDALyC. 2009 [consultado: 07-septiembre-2014]; 14(68): [aprox. 30 pantallas]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199520297006>.

²⁰ Bangham, "A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids. Nature, 23, 1961.

²¹ Bangham, "Membrane models with phospholipids". ProgBiophysMol Biol. 1968.

²² Torello M, Viscasillas A, Del Pozo A. Liposomas (I), Conceptos generales y relación

con las estructuras cutáneas. Elsevier [revista en internet]. 2002 [Fecha de consulta: 4 de septiembre del 2014]; 21 (9). Disponible en:http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13038745&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=4v21n09a13038745pdf001.pdf&ty=166&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es

²³ Helfrich, W., Elastic Properties of Lipid Bilayers. Theory and Possible Experiments. *Z. Naturforsch.* 1973; 28: 10.

²⁴ Ruano A. M. Fabricación de liposomas y cápsulas poliméricas [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas; 2013. [en línea] [consultado: 18-agosto-2014]. Disponible en URL: <http://eprints.ucm.es/18042/1/T34218.pdf>.

²⁵ Lasic, D., Liposomes in Gene Delivery, in CRC Press, B. Ratón, Editor. 1997.

²⁶ Smyth, N.L., D., New Directions in Liposome Gene Delivery. *Mol. Biotechnol.*, 1999. 11: p. 5.

²⁷ Pan D. Nanomedicine: A Soft Matter Perspective [libro electrónico]. Florida: Taylor & Francis Group; 2014 [Consultado 11 de septiembre de 2014]. Available from:

<http://books.google.com.mx/books?id=72ULBAAAQBAJ&pg=PA46&dq=liposome+manufacturing+process+article&hl=en&sa=X&ei=CW0JVKe6Cse3yATtn4GICg&ved=0CDwQ6AEwBjgU#v=onepage&q=liposome%20manufacturing%20process%20article&f=false>

-
- ²⁸ Hernández M, Alvarado A. Interleucinas e inmunidad innata. Rev Biomed [revista en internet]. 2001 [fecha de consulta 2015 agosto 16]; 12(4): [aprox. 9 pantallas]. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb011248.pdf>
- ²⁹ Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. Crit Care Med. 2000; 28 (Suppl):N3- 12.
- ³⁰ Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA – A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 742-780.
- ³¹ Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA et al. – Cytokines for surgeons. Am J Surg. 2002;183:268-273
- ³² Lin E, Calvano SE, Lowry SF – Inflammatory cytokines and cell response in surgery. Surgery. 2000;127:117-126
- ³³ Ali G, Boldrini L, Lucchi M et al. – Treatment with interleukin-2 in malignant pleural mesothelioma: immunological and angiogenetic assessment and prognostic impact. Br J Cancer. 2009; 101: 1869-1875.
- ³⁴ Aulton M. Farmacia de la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2ª ed. Reino Unido: Elsevier; 2004.
- ³⁵ Gibson M. Pharmaceutical preformulation and formulation a practical guide from candidate drug selection to comercial dosage form. U. S. A.: crc Press; 2001.
- ³⁶ International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH harmonized tripartite guidline. Pharmaceutical development Q8 (R2). Agosto, 2009.

³⁷ Ahuja S, Scypinki S. Handbook of modern pharmaceutical analysis. Volumen III. San Diego, USA: Academic press. 2001.

³⁸ Cilla I; Martínez L; Beltrán J. y Roncalés P. 2005. Efecto de la preservación por bajas temperaturas en la calidad de un jamón seco y curado: Jamón deshuesado refrigerado y cortes de jamón congelados. España. Universidad de Zaragoza.

³⁹ WIPO [internet]. Ginebra: OMPI; [citado 2015 junio 15]. Las búsquedas sobre el estado de la técnica: una obligación para las pymes innovadoras [aproximadamente 7 pantallas].

⁴⁰ World International Propriety Organization. Curso general sobre propiedad intelectual DL-101 (2014). Módulo 8. Patentes.

⁴¹ INAPI, Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Búsqueda del estado de la técnica, patentes de invención, modelos de utilidad, Guía-Ejemplo. [internet]. Santiago Chile: INAPI; 2012 [citado 2015 junio 15]. Disponible en: http://www.inapi.cl/portal/institucional/600/articles-979_recurso_1.pdf

⁴² Vidal R. Instrumentos de protección intelectual: naturaleza de la patente. Características del proceso para entregar una patente. EPISTEMUS [revista en internet]. 2008 [consulta 2015 agosto 16]; 1 (4): [aprox. 93 pantallas]. Disponible en: <http://www.epistemus.uson.mx/>

⁴³ Francisco Gonzalo Bolívar Zapata. Por un uso responsable de los OGM. ACM, 2012.

⁴⁴ Pérez E, Fernández A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. ELSEVIER [internet]. 2015 [citado 2015

mayo 18]; 93: 52-79. Disponible en:

file:///C:/Users/umiez/Desktop/XSL,%20JCS,%20MOBM,GREI/quimio.pdf

"El mundo está en manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y de correr el riesgo de vivir sus sueños." Paulo Coelho