



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

**“Optimización de un sistema farmacéutico que comprende
liposomas con Interleucina 2 en gel y redacción de la patente”**

TESIS EXPERIMENTAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

PRESENTA:

JOSÉ CARLOS SÁNCHEZ AGUIRRE

DIRECTOR: DR. BENNY WEISS STEIDER

ASESOR: DR. RAMÓN SOTO VÁZQUEZ

Ciudad de México, 2016



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 experimental fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ FES-Zaragoza, Campus II, UNAM; bajo la Dirección del Dr. Benny Weiss Steider y la asesoría del Dr. Ramón Soto Vázquez y la Dra. Ma. Teresa Corona Ortega con financiamiento del proyecto PAPIIT IN-219315, IN-228111 y IN-214113”

Agradecimientos

A **Dios** y **San Judas Tadeo**, por tomarme de la mano y guiarme a lo largo de este camino, por escucharme y atender a mis peticiones, por el apoyo brindado desde que tengo uso de razón.

A mis **Padres**, quienes desde niño me han inculcado valores y amor para que sea un hombre de bien, demostrándome que mediante el trabajo, humildad y perseverancia es posible conseguir tus sueños. A mi padre, José Martín Sánchez Urenda, que a pesar de que fue apartado físicamente de mi vida, siempre ha estado presente en mi mente y corazón, apoyándome, protegiéndome y guiándome en cada paso que doy, que en el tiempo que estuvo conmigo siempre me demostró su amor y su cariño. A mi madre, Rosalía Aguirre Carrasco, por ser la persona a la que más amo y admiro, por todos sus sacrificios que ha hecho para tratar de darme todo en la vida, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ser mi confidente y quien con un abrazo me transmite amor, fuerza, valor y ánimos para salir adelante en la vida, por ser quien siempre está detrás de mí por cualquier cosa que necesite, a pesar de ya no ser un niño. Ahora sé muy bien que la mujer de la frase *“detrás de un gran hombre hay una gran mujer”*...es mi MADRE.

A mis **Hermanas**, Vanessa y Cinthia, por estar conmigo en todo este trayecto, dándome su amor y apoyo, siendo el mejor regalo que Dios me dio a través de mis padres.

A mi **Tía Ana** y mi **Tío Salvador**, por su cariño y apoyo incondicional, por siempre estar para mí y mi familia en todo momento.

A **Mamá Rosy**, por darme siempre esa cachetada que me transmite cariño y ánimos para seguir adelante.

A mi **Tía**, la Dra. Nery, por demostrarme con base al ejemplo que las metas son alcanzables.

Al **Dr. Ramón Soto Vázquez**, por brindarme la oportunidad y confianza de ser participe en este proyecto, por su apoyo incondicional, por compartirme sus conocimientos y consejos, tanto como profesionista y como persona.

A la **Dra. Ma. Teresa Corona Ortega**, quien a pesar de que su nombre no se mencione en la portada, quiero constatar que ella ha sido una asesora más de este proyecto, no solo brindándome los recursos necesarios para la realización del proyecto, sino por estar al pendiente de mí y apoyarme en todo momento.

Al **Dr. Benny Weiss Steider**, por depositarme su confianza, tiempo, apoyo y conocimiento.

A la **Dra. Rosalva Rangel Corona**, por compartirme sus conocimientos y apoyarme en cada momento.

A la **Mtra. Guadalupe Gómez García** y a la **Mtra. Reyna Lara Martínez**, por brindarme su tiempo y conocimientos durante las lecturas en el citómetro de flujo y en el microscopio electrónico respectivamente.

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

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

Al **Q.F.B Cristian Cruz Vázquez**, por compartirme sus conocimientos en los procesos de producción realizados a lo largo del proyecto.

Al **Sr. Chavarría Mancilla José**, quien es parte fundamental para el funcionamiento de los proyectos del laboratorio.

A mis **amigos**, que fueron parte importante en esta maravillosa etapa de mi vida.

Y especialmente a la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**, por brindarme la oportunidad de estudiar una licenciatura, por forjarme como profesionista, pero sobre todo como ser humano.

Índice

1. Introducción	8
2. Marco teórico	9
2.1. Biotecnología.....	9
2.1.1. La Biotecnología en México.....	10
2.2. Nanotecnología	11
2.3. Liposomas.....	12
2.3.1. Clasificación	14
2.3.2. Uso de los liposomas en la Industria farmacéutica	15
2.4. Desarrollo farmacéutico	16
2.4.1. Preformulación	16
2.4.2. Formulación.....	17
2.4.3. Optimización	17
2.4.4. Estabilidad.....	18
2.5. Forma farmacéutica.....	19
2.5.1. Geles	20
2.6. Cáncer.....	27
2.6.1 Cáncer Cérvico Uterino.....	28
2.6.2 Tratamiento	29
2.6.2.1 Inmunoterapia con Interleucina-2.....	30
2.7. Propiedad Intelectual.....	31
2.7.1. Actualidad de la Propiedad Intelectual en México	32
3. Planteamiento del problema.....	34
4. Hipótesis.....	36
5. Objetivo general	37
5.1. Objetivos específicos	37
6. Tipo de estudio	38
7. Material.....	39
8. Metodología	40
8.1 Síntesis del espermidil-colesterol	41
8.2 Fabricación de liposomas	41
8.3 Fabricación del gel.....	41

8.4 Evaluación del sistema farmacéutico	42
8.4 Redacción de la patente	43
9. Resultados	46
9.1 Síntesis del espermidil-colesterol	46
9.2 Evaluación de geles mediante Citometría de Flujo	46
9.3 Evaluación de geles por Microscopia Electrónica de Transmisión	54
9.4 Evaluación de la actividad biológica de la IL-2 mediante ELISA.....	56
9.4.1. Curva estándar para la cuantificación de interleucina 2	57
9.4.2. Determinación de IL-2 en el sistema farmacéutico.....	59
10. Análisis de Resultados	61
11. Conclusiones	64
12. Referencias.....	65

1. Introducción

La industria farmacéutica es uno de los sectores más importantes de la economía actual y sus descubrimientos han representado grandes avances en el tratamiento de enfermedades crónicas y de aquellas que causan la muerte a quienes la padecen; entre ellas, el cáncer, que además de ser difícil de diagnosticar, debido a que frecuentemente se presenta como una enfermedad asintomática al inicio, es complicada de tratar, ya que la mayoría de los medicamentos usados no son específicos, lo que conlleva al empeoramiento de la salud física y emocional del paciente, reduciendo notablemente sus posibilidades de retomar una vida sana.

Hoy en día, las alternativas farmacéuticas basadas en la Biotecnología son clave en el desarrollo industrial debido a la aplicación de sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos; uno de ellos la encapsulación de fármacos dentro de nanopartículas, con la finalidad de direccionar el principio activo al sitio de acción además de reducir los efectos secundarios al disminuir su contacto con otras células sanas.

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar el periodo de estabilidad de un sistema farmacéutico que comprende liposomas con interleucina 2 (IL-2) en gel y posteriormente contribuir en la redacción de una patente que contenga la información suficiente para sustentar y proteger la invención.

2. Marco teórico

2.1. Biotecnología

La Biotecnología es sin duda una de las áreas tecnológicas clave en el desarrollo industrial contemporáneo. J. Coombs expresa que por biotecnología debe entenderse la “...Aplicación de organismos, sistemas biológicos o procesos biológicos a las industrias de manufacturación de servicios. Esta definición puede extenderse e incluir cualquier proceso en el que se utilicen organismos, tejidos, células, orgánulos o enzimas aislados para convertir materias primas de tipo biológico en productos de mayor valor, así como el diseño y uso de reactores, fermentadores, procesos de purificación, equipos de control y análisis asociados a procesos de producción biológica. Ciertos aspectos de la ingeniería genética y bioingeniería también se incluyen, dentro del término de biotecnología, así como también algunos aspectos de la agricultura, horticultura y silvicultura en los que se utilizan técnicas de propagación o manipulación genética *in vitro*...”¹.

Es generada en diversas disciplinas, como la Biología Molecular, la Ingeniería Genética, la Ingeniería Bioquímica, la Microbiología, la Inmunología y permite un estudio integral en la manipulación de los sistemas biológicos como microbios, plantas y animales, buscando hacer un uso inteligente y respetuoso de la biodiversidad mediante el desarrollo de tecnología eficaz, que sea limpia y competitiva, para facilitar la solución de problemas en sectores como el de salud, agropecuario, industrial y de medio ambiente².

2.1.1. La Biotecnología en México

“En México, prácticamente toda la investigación en el campo de la Biotecnología se desarrolla en centros e instituciones gubernamentales o dependientes de las universidades. Muy poca investigación y desarrollo tecnológico se lleva a cabo en empresas”².

A continuación, se resume por sectores la aplicación de la Biotecnología en nuestro país:

- ❖ **Sector agrícola:** Las investigaciones se encuentran orientadas a generar plantas resistentes a cambios climáticos drásticos y herbicidas que permitan sobreproducción de elementos nutricionales, biopesticidas y certificación de semillas, sustituyendo el uso de fertilizantes químicos².
- ❖ **Sector alimentario:** Se desarrollan tecnologías para la producción de alimentos o productos intermedios como enzimas, colorantes, edulcolorantes polisacáridos².
- ❖ **Sector salud:** Se realizan proyectos en áreas tales como vacunas, métodos de diagnóstico, terapia génica, evaluación de enfermedades en humanos utilizando animales transgénicos, producción de proteínas recombinantes para el tratamiento de enfermedades, fármacos, trasplantes más seguros².
- ❖ **Sector medio ambiente y control de la contaminación:** En este sector se trabaja en el tratamiento de suelos contaminados, instalación de plantas de tratamiento y con transferencias de tecnología².

2.2. Nanotecnología

Es un concepto que indica la capacidad de trabajar en escala 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 tridimensionales de hasta 100 nm en cada una de las dimensiones ³.

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 con la que se difunde se advierte en la creciente 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 ³.

2.3. 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 ⁴. Desde entonces, se han convertido en herramientas versátiles en Biología, Bioquímica y Medicina.

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 anfifílicas⁵.

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. 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 ⁴.
- ❖ Parte apolar. Consiste normalmente en una o dos cadenas de ácidos grasos de 14-18 carbonos de longitud, saturados o insaturados (de 1 a 4 dobles enlaces) ⁴.

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 ⁶.

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 ⁶.

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 ⁶.

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, les permiten acceder con mayor facilidad a determinados tejidos, por ejemplo tumores. 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 confiere la capacidad de interactuar con las estructuras presentes en la superficie de las células ⁷.

2.3.1. Clasificación

Para que los liposomas se formen es necesario que se alcance una concentración mínima, conocida como concentración vesicular crítica (cvc). Además de este parámetro, las disoluciones vesiculares se caracterizan por la lamellaridad vesicular, la polidispersidad de tamaños y la micropolaridad de los diferentes microentornos vesiculares. La clasificación de los liposomas se puede realizar en base a tres criterios: atendiendo a sus características fisicoquímicas, tomando en cuenta su tamaño y el número de bicapas o lamelas que conforman la pared del liposoma, al proceso por el que han sido elaborados, ya que influye directamente en su tamaño y complejidad y a las aplicaciones mismas de los liposomas como consecuencia de las modificaciones que, con diferentes fines, se hayan podido introducir en su estructura ⁸.

2.3.2. Uso de los liposomas en 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, para el diagnóstico y tratamiento de una infinidad de enfermedades, como el cáncer y ya en los últimos años en la terapia génica ⁹.

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 ⁹.

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 al presentar una estructura similar a la celular debido a que se fusionan con las membranas celulares ⁹.

2.4. 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 ¹⁰⁻¹².

2.4.1. 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 ¹¹⁻¹⁴.

2.4.2. 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 valioso 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 ^{10-12, 15}.

2.4.3. Optimización

La optimización definirá e investigará los parámetros críticos del proceso, variando éstos dentro de las limitaciones prácticas en las cuales puede ser fabricado un

producto, es decir, identificará todos los parámetros 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 ¹¹.

2.4.4. 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 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 como: temperatura, humedad o luz. Los estudios de estabilidad permiten establecer las condiciones de almacenamiento, periodos de reanálisis y vida útil ¹⁶.

2.4.4.1. Criopreservación

Es una serie de técnicas que tienen como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. Algunas sustancias con capacidad de actuar como criopreservadores son: azúcares (sacarosa, trehalosa),

polioles (manitol, sorbitol, inositol), algunas sales, aminoácidos (glutamato) y sustancias proteicas (peptona, leche descremada).

La refrigeración y congelación son las principales técnicas de conservación, consiste en la aplicación de bajas temperaturas, 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. 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; al igual que en los acarreadores de fármacos como los liposomas, debido a que presentan una bicapa lipídica en su estructura, asemejando su comportamiento al celular en el proceso de congelación, provocando su ruptura y la liberación del fármaco de forma no deseada, por lo que 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 ¹⁷.

2.5. Forma farmacéutica

Es la mezcla de uno o más fármacos con o sin aditivos, que permita su administración ¹⁶. Éstas se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios, las más comunes son: vía de administración (enteral y parenteral) y estado físico (líquido, sólido, semisólido).

2.5.1. Geles

Preparación semisólida, que contiene el o los fármacos y aditivos, constituido por lo general por macromoléculas dispersas en un líquido que puede ser agua, alcohol o aceite, forman una red que atrapa al líquido y le restringe su movimiento, por lo tanto son preparaciones viscosas.

Vía de administración: bucal, oral, tópica, cutánea ¹⁸.

2.5.1.1. Usos de los geles

Son utilizados con más frecuencia en tratamientos farmacéuticos y cosméticos por varias propiedades importantes, como su estado semisólido, su grado de claridad, facilidad de aplicación, remoción y uso. Pueden ser usados debido a que:

- ❖ Sirven como vehículos para fármacos de aplicación tópica, como emolientes, vendajes oclusivos o como protección y para la aplicación sobre las membranas mucosas.
- ❖ Se utilizan como matrices para preparaciones de liberación prolongada.
- ❖ Son lubricantes para catéteres, bases para pruebas con parches cutáneos o geles de cloruro de sodio para electrocardiografía.
- ❖ Su uso como cosmético incluyen geles para baño, para después de afeitarse y pantallas solares ^{13, 19}.

2.5.1.2. Clasificación

A. De acuerdo a su comportamiento frente al agua

- ❖ Geles hidrófilos o hidrogeles

Las bases generalmente consisten en agua, glicerol o propilenglicol, gelificados con agentes como tragacanto, almidón, derivados de la celulosa, polímeros de carboxivinilo y silicatos de magnesio y aluminio ¹⁹.

❖ Geles hidrófobos, lipogeles u oleogeles

Las bases generalmente consisten en parafina líquida con polietileno, aceites grasos gelificados con sílice coloidal, jabones de aluminio o zinc ¹⁹.

B. En función del origen y/o naturaleza de los polímeros.

Tabla 1. Origen de los polímeros ^{20, 21}.

Polímeros	Ejemplos
Polímeros naturales	Alginatos, carragenina, tragacanto, goma xantana
Polímeros naturales modificados	Metil, etil y carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa
Polímeros o copolímeros vinílicos	Alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidona (PVP), polivinilmetil éter
Polímeros carboxivinílicos	Carbómero
Polímeros acrílicos- acrilamidas	Ácido carboxipoliacrílico, acrilato de metilo, acrilato de etilo, metacrilato de metilo

C. Número de fases.

❖ Geles monofásicos.

Consisten en macromoléculas orgánicas distribuidas de modo uniforme a través de un líquido de manera que no existan límites aparentes entre las macromoléculas dispersas y el líquido. Pueden obtenerse de macromoléculas sintéticas o de gomas naturales, estas últimas se llaman también mucílagos. Si bien los geles generalmente son acuosos, pueden utilizarse alcoholes o aceites como fase continua ¹⁹.

❖ Geles bifásicos.

Cuando la masa del gel consiste en una red de partículas pequeñas separadas, se clasifica como sistema bifásico. Su comportamiento es tixotrópico porque forman semisólidos en reposo y se tornan líquidos después de agitar la preparación. Estas preparaciones deben agitarse antes de usarse para garantizar su homogeneidad ¹⁹.

D. Geles de emulsión.

Pueden ser producidos por la combinación de aceite, agua y ciertos emulsificantes. Estas combinaciones dan como resultado la formación de microemulsiones, estas sirven para formar geles de emulsión.

En un gel de emulsión, la fase continua tiene una fracción volumétrica pequeña, y consiste en una red de películas líquidas finas que separan la fase dispersa, cuyas gotas están deformadas y desarrollan una descripción geométrica de células poliédricas ^{21, 22}.

❖ Geles hidrófobos con emulsionantes.

La capacidad de absorción de los geles hidrófobos puede elevarse apreciablemente por la adición de los emulsionantes adecuados. Los geles hidrófobos secos que contienen emulsionantes con los cuales forman con agua sistemas de emulsión W/O, son indicados también como bases de absorción.

Como emulsionantes se utilizan en la mayor parte de los casos los alcoholes de lanolina ²².

❖ Geles hidrófilos con emulsionantes.

Las bases de emulsión hidrófilicas permiten mediante la adición de agua la preparación de geles de emulsión O/W. Como emulsionantes se utilizan principalmente los estearatos ²³.

E. Xerogeles.

Los geles con baja concentración de disolvente, son conocidos como xerogeles. Estos son a menudo producidos por la evaporación del disolvente, dejando atrás la estructura de gel. Pueden volver al estado de gel por la introducción de un agente que hinche la matriz de gel ^{21, 24}.

2.5.1.3. Componentes

Los principales componentes de un gel son:

- ❖ **Vehículo.** Medio en cual se disolverá el principio activo. El agua purificada es el disolvente más común. Sin embargo, los cosolventes pueden ser utilizados, para mejorar la solubilidad. Ej.: agua, etanol, propilenglicol.

- ❖ **Agente gelificante.** Forma la red tridimensional. Ej.: hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carbopol, noveon.
- ❖ **Agente modificador de pH.** Ayuda a la formación de la red tridimensional del gel al modificar el pH. Ej.: hidróxido de sodio, trietanolamina, hidróxido de potasio.
- ❖ **Amortiguador.** Se pueden incluir en geles acuosos e hidroalcohólicos para controlar el pH de la formulación. Ej.: solución amortiguadora de fosfatos, citratos.
- ❖ **Conservadores.** Previene la aparición de agentes microbianos. Ej.: metilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico.
- ❖ **Antioxidantes.** Aumentan la estabilidad química de los agentes terapéuticos que son propensos a la degradación oxidativa. La elección del antioxidante se basa en la naturaleza del vehículo. Ej.: metabisulfito de sodio, ácido ascórbico, ácido cítrico.
- ❖ **Edulcorantes / saborizantes.** Los sabores y edulcorantes sólo se incluyen en geles diseñados para la administración en la cavidad oral. Ej.: sacarina sódica (edulcorante), cítricos (saborizante).
- ❖ **Colorantes.** Cuando apliquen (sólo podrán usarse colorantes autorizados por las distintas farmacopeas). Ej.: ultramarino, violeta de manganeso, óxido de zinc ^{24, 25}.

2.5.1.4. Ventajas y desventajas

En la Tabla 2 se describen las ventajas y desventajas de los geles.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los geles ^{11, 13, 19, 24}.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Aplicación externa y fácil	Al ser la piel una barrera de protección, algunas mezclas no penetran completamente.
Fácil liberación del fármaco	Los lípidos generalmente presentan resistencia al paso de los fármacos.
Poseen la habilidad de permanecer en la superficie de aplicación por un tiempo determinado	Las moléculas pequeñas penetran con mayor rapidez que las de gran tamaño
Si la base es agua, son preparaciones lavables además de permitir la respiración percutánea.	Materiales de alto peso molecular presentan penetración variable
Pueden tener efecto local y/o sistémico	Pueden causar irritación en el área de aplicación
Pueden ser aplicados directo a las mucosas, lo cual permite una mayor rapidez de penetración a la circulación sistémica.	A temperaturas elevadas pueden volverse líquidos.
Los geles a menudo proveen una liberación más rápida del activo, en comparación con las cremas y pomadas.	Los agentes terapéuticos que son propensos a hidrólisis no deben ser formulados en geles acuosos.
Pueden ser formulados para proporcionar excelentes propiedades de propagación y proporcionará un efecto de enfriamiento debido a la evaporación del disolvente.	Son susceptibles a contaminación microbiana, sobre todo cuando están fabricados en base hidrófila.
Dependiendo de sus constituyentes el gel puede ser claro u opaco.	Pueden presentar sinéresis, es decir, expulsar el disolvente.

2.5.1.5. Mecanismos de formación

- ❖ Polímeros que dan lugar a un gel dependiendo del pH del medio.

Algunos polímeros dan lugar a soluciones ácidas de aspecto lechoso, que al neutralizar con las bases adecuadas aumentan la viscosidad y disminuyen la turbidez del medio. El mecanismo de formación del gel a distintos valores de pH, se lleva a cabo cuando se disocia una pequeña proporción de grupos carboxílicos del polímero, formando una espiral flexible, la adición de una base provoca la disociación de grupos carboxílicos ionizándose, creando repulsión electrostática entre las regiones cargadas, expandiéndose las moléculas a un punto de equilibrio entre las mismas, haciendo más rígido el sistema y por lo tanto gelificándolo. Un exceso de base puede producir una pérdida de viscosidad al neutralizarse los grupos carboxílicos, con la consiguiente desaparición de las cargas electrostáticas ²⁴.

- ❖ Polímeros que dan lugar a un gel por sí mismos (independiente del pH del medio).

Aquellos que no precisan de neutralización para la formación del gel, establecen puentes de hidrógeno entre el disolvente y los grupos carboxílicos del polímero. De este modo, las moléculas del disolvente se orientan a lo largo del polímero aumentando la rigidez del sistema ²⁴.

2.5.1.6. Métodos de fabricación

En la fabricación de geles, generalmente, los componentes y/o excipientes solubles en agua son inicialmente disueltos en el vehículo, en un recipiente de mezcla con agitación mecánica. El polímero debe agregarse a la mezcla y agitar lentamente para evitar la agregación, y se continúa la agitación hasta la disolución del polímero. En caso de que el agente gelificante necesite ser neutralizado, se debe permitir la desaireación antes de agregar el agente neutralizante y agitar de manera lenta. Finalmente se agregan los conservadores y en caso de requerirlos los colorantes y saborizantes.

Los geles obtenidos varían su viscosidad según el polímero presente, la técnica y el tiempo empleado en su agitación^{13, 24}.

2.6. Cáncer

Es un término que se usa para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos. Las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático²⁵.

Se clasifican en varios grupos dependiendo del tipo de células desde las que se desarrollan²⁶.

- **Carcinomas.** Son los más comunes (80%). Se originan a partir de las células epiteliales que recubren las superficies del organismo. Dentro de ellos se distinguen:

- ❖ **Adenocarcinomas.** Surgen en el tejido glandular (mama y próstata).
 - ❖ **Carcinoma de células escamosas o epidermoide.** Se producen en células no glandulares (esófago, cuello de útero, etc.)
 - ❖ **Carcinoma de células basales.** Se origina en la capa más profunda de la epidermis.
 - ❖ **Melanoma.** Procede de los melanocitos (células que producen la coloración de la piel).
- **Leucemias.** Surgen a partir de los leucocitos, encargados de la defensa ante infecciones. Según las células afectadas se clasifican en mieloides o linfoides.
 - **Sarcomas.** Se originan en el tejido conectivo: cartílago, grasa, músculo, hueso y vasos sanguíneos (condrosarcoma, liposarcoma, miosarcoma, osteosarcoma y angiosarcoma, respectivamente).

2.6.1 Cáncer Cérvico Uterino

Entre los principales tipos de cáncer en mujeres se encuentran el de seno, colon y recto, pulmones y bronquios, cuello uterino, estómago e hígado ²⁷.

El cáncer cérvico uterino consiste en una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos del cuello uterino. Se caracteriza porque crece lentamente y puede no tener síntomas; sin embargo, puede diagnosticarse con un frotis llamado Papanicolaou. La aparición del este cáncer se asocia en más del 90% de los casos con una infección causada por el virus del papiloma humano (VPH) ^{28, 29, 30}.

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 ³¹.

2.6.2 Tratamiento

La selección del tratamiento, depende de la etapa en que se encuentra el cáncer, es decir, si está sólo en el cuello uterino o si se ha diseminado a otras partes del organismo y del estado de salud en general de la paciente. ³²

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). ³²

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, que sean 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. ³²

2.6.2.1 Inmunoterapia con Interleucina-2

En el tratamiento del cáncer en estadios avanzados, se ha empleado la IL-2 sola o en combinación para inducir la respuesta citotóxica anti-tumoral con resultados alentadores ³³⁻³⁵. Sin embargo, su administración en altas dosis, vía sistémica, perturba vías de regulación hematopoyética y puede generar una serie de efectos secundarios adversos, como son: síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, hipotensión, disfunciones respiratorias, renales y hepáticas ^{36, 37, 38}, por lo que se ha limitado su uso en la clínica y se buscan otras formas de administración sin disminuir su actividad. Con el propósito de administrar altas dosis de IL-2 vía sistémica, se ha utilizado a los liposomas como una alternativa. Actualmente sirven como medio de transporte de diferentes medicamentos y citocinas, ya que además de proteger el contenido permite dirigirlos a un tipo celular en particular dependiendo de la composición lipídica y de su carga eléctrica ³⁹⁻⁴³.

La IL-2 es una glucoproteína de 133 aminoácidos, contiene 3 residuos cisteínicos en las posiciones 58, 105 y 125, que forman enlaces disulfuro que son esenciales para la actividad de la molécula. Las células que principalmente secretan IL-2 son linfocitos T, CD4+, CD8+, y los macrófagos. La IL-2 activa la proliferación de linfocitos T, células asesinas naturales (NK) y de los linfocitos B, promoviendo la progresión desde la fase G₁ del ciclo celular, lo que permite un incremento en el número de estas células.³¹ Además que IL-2 también influye en la síntesis de otras moléculas como el interferón γ y el factor de necrosis tumoral (TNF).³²

2.7. Propiedad Intelectual

A lo largo del tiempo, la inteligencia del hombre ha dado lugar a varios tipos de creaciones, los cuales se protegen de diversas formas con diferentes fines que el titular tenga libertad de usar su creación como desee, para que tenga reconocimiento y remuneración, entre otros ⁴⁴.

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 a las nuevas creaciones como a las ya existentes, puede definirse como una nueva solución a un problema técnico ⁴⁴.

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 ⁴⁴.

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 y la libre disponibilidad de una tecnología cuando la patente haya caducado, entre otros ⁴⁴.

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. ⁴⁵

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 ⁴⁶.

2.7.1. Actualidad de la Propiedad Intelectual en México

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 ⁴⁷.

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 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 ⁴⁷.

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, como 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) ⁴⁷.

3. Planteamiento del problema

La Biotecnología es el alcance más importante de las ciencias biológicas de este siglo, ya que hace posible el estudio y la manipulación de los organismos vivos a nivel celular y molecular, mediante toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos. Entre algunas de sus aplicaciones en el campo de la industria farmacéutica se encuentra la de aumentar la especificidad y la eficacia de un principio activo y a su vez disminuir los efectos adversos que pueda propiciar en el organismo.

Un claro ejemplo del resultado de esta área tecnológica es la IL-2 recombinante, que activa la proliferación de linfocitos T, células asesinas naturales (NK) y de los linfocitos B, promoviendo la progresión desde la fase G₁ del ciclo celular, lo que permite un incremento en el número de estas células. De igual forma, influye en la síntesis de otras moléculas como el interferón γ y el factor de necrosis tumoral (TNF). Estas propiedades inmunoregulatoras han hecho que su uso clínico sea alternativa terapéutica en los pacientes con cánceres diseminados resistentes a otros tratamientos, entre los que se encuentran principalmente el melanoma maligno, carcinomas renales, sin embargo, su administración en altas dosis, vía sistémica, perturba vías de regulación hematopoyética y puede generar una serie de efectos secundarios adversos, como son: síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, hipotensión, disfunciones respiratorias, renales y hepáticas. Por lo anterior se ha limitado su uso en la clínica y se buscan otras formas de administración sin disminuir su actividad, entre ellas el uso de liposomas, que

sirven como medio de transporte de diferentes medicamentos y citocinas, ya que además de proteger el contenido, permite dirigirlos a un tipo celular en particular dependiendo de la composición lipídica y de su carga eléctrica.

El encapsulamiento de fármacos en liposomas pueden provocar que los fármacos actúen en el órgano blanco, reduciendo la toxicidad y/o aumentando la eficacia del fármaco, haciendo posible una mayor absorción local del mismo alterando fuertemente su distribución y su tasa de liberación en el cuerpo, protegiéndolos contra una posible degradación o inactivación.

Con base a lo anterior; en el presente trabajo, se realizó la optimización de un sistema farmacéutico que comprende liposomas con interleucina 2 en diferentes geles a base de agua miliQ y soluciones amortiguadoras, formulados con distintas concentraciones del agente gelificante y con agentes criopreservadores, almacenados a diferentes temperaturas de congelación, a fin de determinar los componentes de la formulación y la, o en su caso, las temperaturas en las cuales se mantiene estable. Estos resultados aportarán evidencias para la futura presentación de un medicamento efectivo, potente, inocuo y puro y además apoyarán con ejemplos la redacción de la solicitud de patente respectiva.

Por otro lado, si la patente de este proceso de optimización es concedida, además de evidenciar el avance tecnológico logrado puede ayudar a extender el período de protección para el sistema acarreador de IL-2 que ya tiene una patente otorgada.

4. Hipótesis

Sabiendo que las soluciones amortiguadoras o buffer, son sustancias capaces de mantener la acidez o basicidad de un sistema dentro de un intervalo de pH, se espera que alguna solución amortiguadora en comparación con el agua miliQ, mantenga el pH óptimo de los liposomas en el gel, conservando así, su integridad ante los cambios de pH que pueden ser ocasionados por los productos de degradación de alguno de los componentes en la formulación. Además, conociendo que la viscosidad de un gel es mediada principalmente por la cantidad de agente gelificante contenida en su formulación, se espera que al preparar geles a diferentes concentraciones de agente gelificante, se presente una mayor estabilidad de la forma farmacéutica en el gel con mayor contenido del mismo, dado que se espera que al presentar el gel una alta viscosidad y que los liposomas son de un tamaño de partícula pequeño, su movimiento sea restringido, evitando su sedimentación.

5. Objetivo general

Optimizar la formulación de un sistema farmacéutico que comprende liposomas con IL-2 en gel, empleando un agente gelificante a diferentes concentraciones formados con distintos vehículos, mediante un estudio de estabilidad a bajas temperaturas, a fin de determinar el vehículo, la concentración de agente gelificante y la, o las temperaturas, a la cual se mantiene estable; así como utilizar estas evidencias para sustentar la respectiva patente.

5.1. Objetivos específicos

- Sintetizar el espermidil colesterol para la formación de los liposomas.
- Fabricar los sistemas farmacéuticos que comprenden liposomas con IL-2 en gel que se someterán al estudio de estabilidad a bajas temperaturas.
- Evaluar el sistema farmacéutico mediante citometría de flujo, microscopia electrónica y ELISA para determinar la estabilidad del sistema en el transcurso del estudio.
- Realizar el estudio del estado de la técnica que sustente la patente.
- Colaborar en la redacción de la patente.

6. Tipo de estudio

Forma de recolección de información: Retrospectivo.

Secuencia temporal del estudio: Longitudinal.

Cantidad de poblaciones: Comparativo.

Actitud del investigador: Experimental.

Población de Estudio. Geles de 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.

Variables:

- **Independiente:** Tipo de vehículo y cantidad de agente gelificante utilizado en la fabricación de los geles.
- **Dependiente:** Cantidad, tamaño y complejidad de los liposomas, Contenido de IL-2.

7. Material

- Material de vidrio
 - Vasos de precipitados de 50 mL y 100 mL.
 - Varillas de agitación.
 - Pipeta graduada 1 mL
 - Tubos de 13 x 100 marca Pyrex
 - Pipetas Pasteur

- Material General
 - Tubo cónico de 50 mL marca Eppendorff
 - Jeringas de plástico de 10 mL.
 - Barra magnética
 - Puntas para micropipetas diferentes capacidades
 - Frascos viales diferentes capacidades
 - Placas para ELISA Sarsted Catalogo 82.1581
 - Gradilla

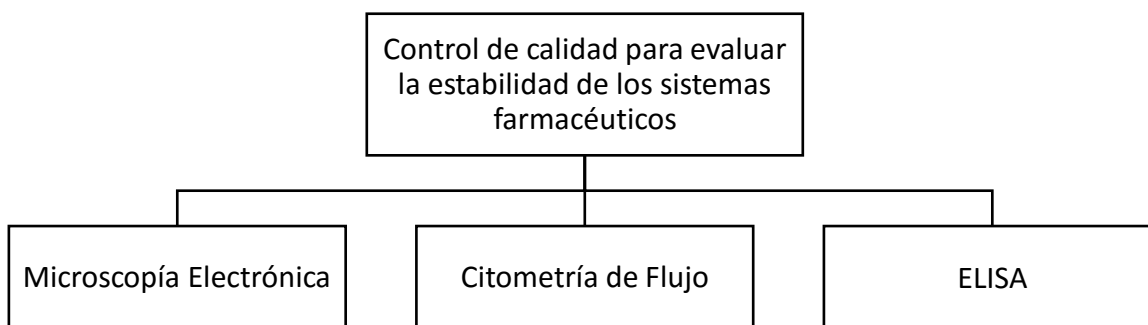
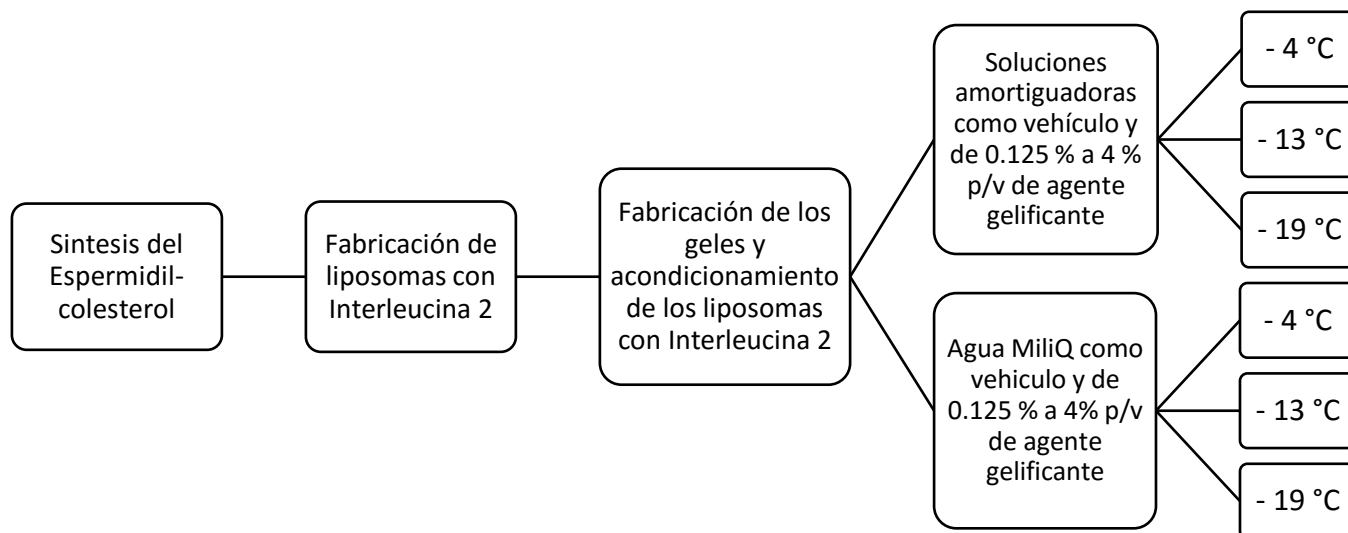
- Equipo
 - Campana de flujo laminar.
 - Placa de agitación y calentamiento.
 - Bomba para vacío
 - Ultracentrifuga Modelo Beckman INV 1272811
 - Rotor SW40-1, Camisas Número de Serie L92L831
 - Microscopio electrónico.
 - Sonicator

- Instrumentos
 - Balanza Analítica Denver Instruments
 - Potenciómetro Denver Instruments UV-10, Ultra Basic.
 - Citómetro de flujo FACSARIA 2 Becton Dickinson.
 - Lector de ELISA ELx800

- Reactivos
 - Espermidil Colesterol
 - Colesteril Cloroformato
 - Espermidina base
 - Cloroformo
 - Nitrógeno
 - Noveon AA1
 - Trietanolamina
 - IL-2 humana recombinante
 - Soluciones amortiguadoras
 - Agua miliQ

8. Metodología

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



8.1 Síntesis del espermidil-colesterol

Se preparó una solución de espermidina base en exceso a 0 °C y se le adicionó gota a gota una solución de colesteril cloroformato, se evaporó el disolvente a sequedad a vacío y se purificó el espermidil colesterol por cristalización.

8.2 Fabricación de liposomas

Se pesó espermidil-colesterol y fosfatidilcolina y se colocaron en un tubo de ensayo, se agregó cloroformo a la mezcla de lípidos y se agitó hasta que se observó una solución, posteriormente el disolvente fue evaporado mediante una corriente de nitrógeno y se agregó IL-2 en cantidad suficiente, se sonicó y ultracentrifugó para eliminar la IL-2 no encapsulada y el sobrenadante fue retirado, por último se resuspendió en el diluyente elegido, el cual contiene agentes criopreservadores según la solicitud de patente mexicana con número de expediente MX/a/2015/013539.

8.3 Fabricación del gel

Se hirvió agua miliQ y se prepararon las soluciones amortiguadoras de citrato, acetato y fosfato. Se surtieron las materias primas (Noveón AA1 y Trietanolamina). Se colocó la cantidad suficiente de Noveón AA-1 para obtener once concentraciones de 0.125% a 4% p/v y se dejaron hidratar ya sea con agua miliQ o con las soluciones amortiguadoras. Después de 24 horas se mezcló y se ajustó el pH con trietanolamina, se adicionó la solución de liposomas y se mezcló. Finalmente se acondicionó el gel en frascos viales de 2 mL y se etiquetaron.

Se almacenó cada vial a la temperatura correspondiente para llevar a cabo el estudio de estabilidad.

8.4 Evaluación del sistema farmacéutico.

Estudio inicial, se realizó terminando la fabricación del sistema farmacéutico, es decir, tiempo cero o prueba basal, la cual sirvió como parámetro para comparar las propiedades de los sistemas con forme a las evaluaciones obtenidas a lo largo del estudio.

Consistió de: microscopía electrónica, citometría de Flujo, ELISA.

- **Microscopía electrónica:** Evaluó la morfología de los liposomas por tinción negativa. Se colocaron 5 microlitros de una disolución del sistema en rejillas recubiertas de Formvar. Después de cinco minutos se retiró el sobrante con papel absorbente y se le agregó acetato de uranilo por cinco minutos, se dejó secar y se observó al microscopio electrónico.
- **Citometría de flujo:** Se usó para evaluar tamaño y complejidad relativos de los liposomas que conforman el sistema. Se colocaron disoluciones de éste en el citómetro y se determinó FSC (Tamaño), SSC (Complejidad) y un mapa de puntos que indicó la relación entre los dos parámetros para establecer el área donde se encontró la población inicial.
- **ELISA:** Para determinar la cantidad de IL-2 que aún presenta actividad biológica, se llevó a cabo un ensayo de ELISA conforme al PNO: LOCE121012 “Procedimiento maestro para la cuantificación de IL-2 contenida en un sistema nanoacarreador”. Brevemente, se colocó en cada pozo el anticuerpo de captura MAB-602, luego se bloqueó con una

solución de polivinilpirrolidona (PVP), se colocaron ya sea estándares para la curva correspondiente o muestras del sistema íntegro o lisado con tritón y se añadió 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 evaluaron en un lector a 450 nm.

El muestreo se realizó mensualmente y se realizaron las pruebas antes mencionadas para evaluar su estabilidad, el muestreo finalizó cuando la cantidad de IL-2 en cada uno de los sistemas en estudio fue menor a 60 UI/mL y menor a 75% de nanopartículas o liposomas (cantidades mínimas requeridas para lograr el efecto terapéutico deseado, especificadas en patente concedida No. 330174).

Por motivos de confidencialidad, en esta tesis solo se mostrarán los resultados obtenidos de la evaluación inicial y del mes en que los liposomas contenidos tanto en el gel formulado a base de agua miliQ como en el buffer en el cual se mantuvieron más estables, aún cumplían con las especificaciones mencionadas en la patente concedida No. 330174.

8.4 Redacción de la patente

Se realizó la búsqueda del estado de la técnica, el cual incluyó principalmente: información técnica, investigación exhaustiva de no invasión en bases de datos de patentes mundiales y estudio de mercado. Se redactó la patente, la cual contiene de manera detallada la invención, destacando los puntos a proteger, resumen de no invasión, título, autores y apoderados. Una vez más,

por motivos de confidencialidad no se presenta la redacción final de la solicitud de patente que se encuentra en trámite de presentación en México y España.

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
PLANTA FARMACÉUTICA
LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

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

PAS. DE Q.F.B. JOSÉ CARLOS SÁNCHEZ AGUIRRE
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 "COMPOSICIÓN FARMACEUTICA EN GEL, DE UN NANOSISTEMA TRANSPORTADOR DE CITOCINAS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL", que se encuentra en proceso de presentación. 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 solicitud mencionada.

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

ATENTAMENTE



DR. RAMÓN SOTO VÁZQUEZ
INVENTOR

9. Resultados

9.1 Síntesis del espermidil-colesterol.

Al término de la síntesis del espermidil-colesterol se evaluó su apariencia, olor y se realizó una cromatografía en capa fina para calcular el factor de retención (R_f) de la muestra sintetizada en comparación con un estándar de espermidil-colesterol.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida desde el punto de aplicación al centro del compuesto}}{\text{Distancia recorrida desde el punto de aplicación al frente del eluyente}}$$

Obteniendo así:

$$R_f \text{ estándar} = 0.49$$

$$R_f \text{ muestra} = 0.49$$

Los resultados obtenidos indican que se obtuvo el lípido deseado debido a que su apariencia, olor y R_f fueron iguales al del estándar.

9.2 Evaluación de geles mediante Citometría de Flujo

Para evaluar la cantidad, tamaño y complejidad de los liposomas presentes en los sistemas farmacéuticos antes mencionados, se determinaron dichos parámetros mediante Citometría de flujo. Primero se realizaron los gráficos de puntos que relacionan el tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) de las vesículas dentro del gel y posteriormente los histogramas de tamaño y complejidad correspondientes a los geles con agua a diferentes concentraciones de agente gelificante y a las distintas temperaturas de congelación.

De los gráficos que relacionan la complejidad y tamaño relativos para las poblaciones iniciales, se determinó el área que ocupa esa población (Figura 1A),

en donde la zona coloreada de color rojo (P1) representó la población en estudio y la zona de color verde (P2) la desviación típica debida al proceso de fabricación, para después determinar estadísticamente el porcentaje de la población que ha cambiado en cada condición. Adicionalmente, se obtuvieron los histogramas iniciales de tamaño y rugosidad relativa (Figura 1B y C) para después sobreponer los de cada condición y asociar el cambio de las poblaciones de estudio en alguno o los dos parámetros.

Los resultados indicaron que para la formación de gel, diez de las once concentraciones usadas gelificaron en agua; sin embargo solo un tipo de solución amortiguadora fue capaz de gelificar estas mismas concentraciones de gel; por lo que el estudio continuó solo con agentes gelificantes disueltos en agua y la solución amortiguadora idónea.

Posteriormente, al integrar a los geles fabricados con agua milliQ la suspensión de liposomas, los resultados mostraron que sólo en cuatro de las concentraciones el sistema de liposomas se mantenía íntegro y finalmente solo en una se mantuvo hasta por tres meses conservando el 96.2% de la población inicial (Figura 2A). Los histogramas de tamaño y rugosidad relativa (Figura 2B y C) mostraron que el tamaño de las vesículas se mantenía constante, más no así en la complejidad, debido a que se observó un incremento a causa de una posible aglutinación, aunque cabe señalar que dicho aumento se mantuvo dentro del rango delimitado en la evaluación inicial, por lo que no hubo diferencia significativa (Figura 3A y B). En cuanto a las temperaturas utilizadas no hubo diferencias.

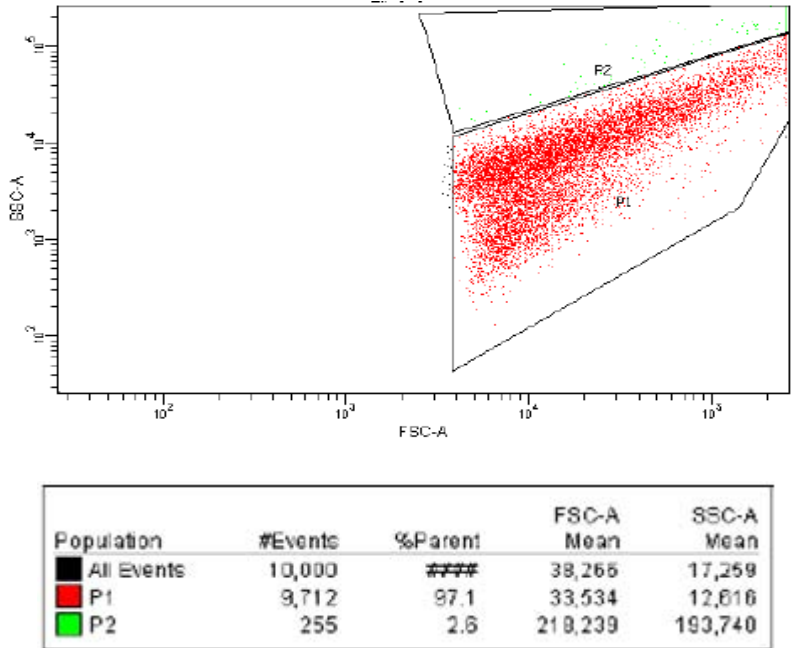


Figura 1A

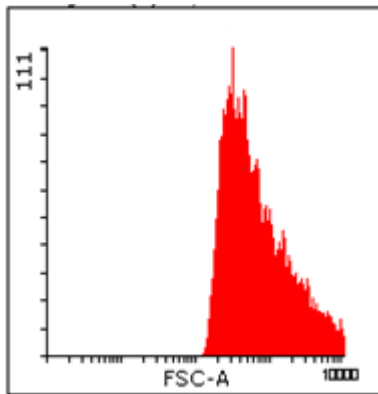


Figura 1B

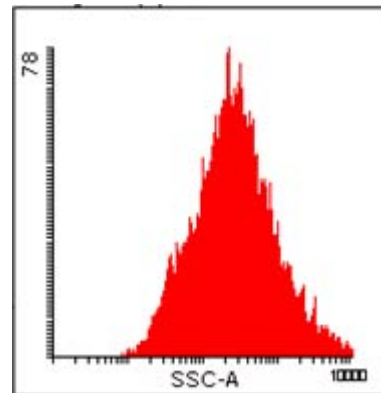


Figura 1C

Figura 1. Figura control o tiempo cero de gel en agua (concentración ideal de agente gelificante). Se utilizo gel en agua miliQ en la mejor concentración y se muestra una de las temperaturas de congelación. A) Gráfica de puntos que relaciona tamaño y complejidad de las vesículas dentro del gel, B) Histograma del tamaño relativo de los liposomas y C) Complejidad relativa de los liposomas.

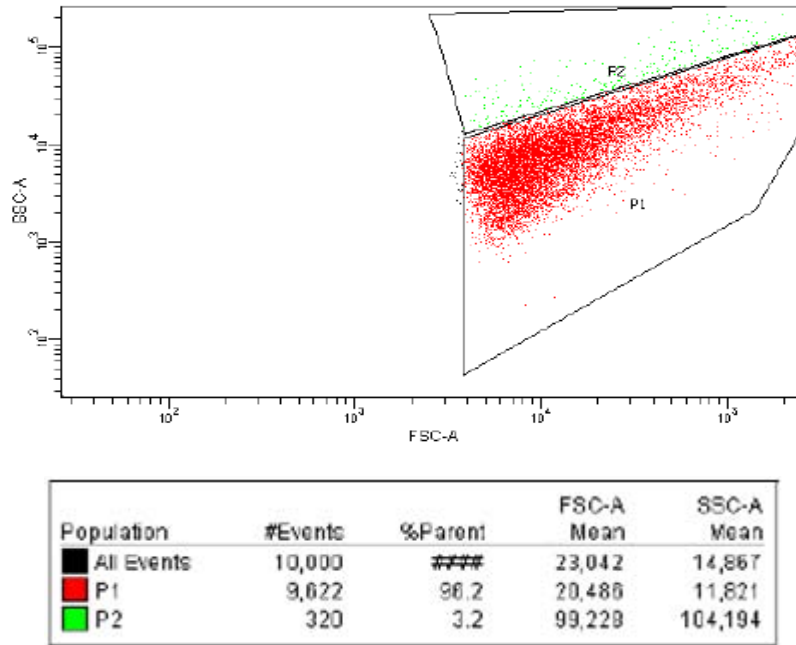


Figura 2A

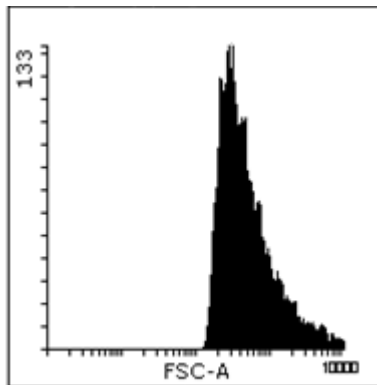


Figura 2B

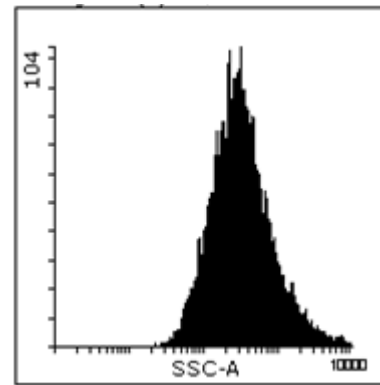


Figura 2C

Figura 2. Figura evaluada al tercer mes de gel en agua (concentración ideal de agente gelificante). Se utilizó gel en agua miliQ en la mejor concentración y se muestra una de las temperaturas de congelación. A) Gráfica de puntos que relaciona tamaño y complejidad de las vesículas dentro del gel, B) Histograma del tamaño relativo de los liposomas y C) Complejidad relativa de los liposomas.

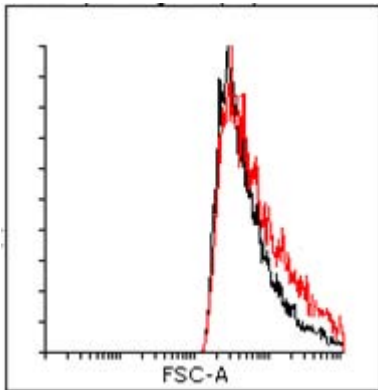


Figura 3A

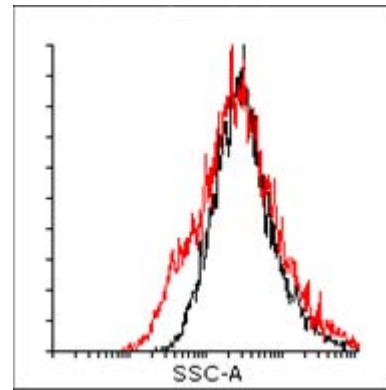


Figura 3B

Figura 3. Figura de sobreposición de histogramas (concentración ideal de agente gelificante). Se realizó la sobreposición de histogramas de gel en agua miliQ al inicio y al tercer mes de evaluación en la mejor concentración, mostrando una de las temperaturas de congelación. A) Histograma de sobreposición del tamaño relativo de los liposomas y B) Histograma de sobreposición de la complejidad relativa de los liposomas.

De la misma forma, se realizaron los gráficos de puntos que relacionan el tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) de las vesículas dentro del gel y los histogramas de tamaño y complejidad correspondientes a los geles con el buffer idóneo a diferentes concentraciones de agente gelificante y a las distintas temperaturas de congelación.

De los gráficos que relacionan la complejidad y tamaño relativos para las poblaciones iniciales, se determinó el área que ocupa esa población (Figura 4A), en donde la zona color de rosa representó la población en estudio y la zona no delimitada la desviación típica debida al proceso de fabricación, que en este caso reveló ser una elevada cantidad de vesículas no homogéneas, después se determinó estadísticamente el porcentaje de la población que ha cambiado en cada condición. De igual forma se obtuvieron los histogramas iniciales de tamaño y rugosidad relativa (Figura 4B y C) para después sobreponer los de cada

condición y asociar el cambio de las poblaciones de estudio en alguno o los dos parámetros.

Los resultados indicaron que al igual que cuando se usó agua, solo cuatro concentraciones de gel mantuvieron a los liposomas íntegros y que sólo una de ellas los mantuvo hasta por seis meses, conservando el 90% de la población inicial (Figura 5A). Los histogramas de tamaño y rugosidad relativa (Figura 5B y C) mostraron que el tamaño de las vesículas se mantenía constante, más no así en la complejidad, debido a que se observó un incremento a causa de una posible aglutinación que al igual que en el gel a base de agua miliQ, se mantuvo dentro del rango delimitado en la evaluación inicial, por lo que no hubo diferencia significativa (Figura 6A y B). En cuanto a las temperaturas utilizadas no hubo diferencias.

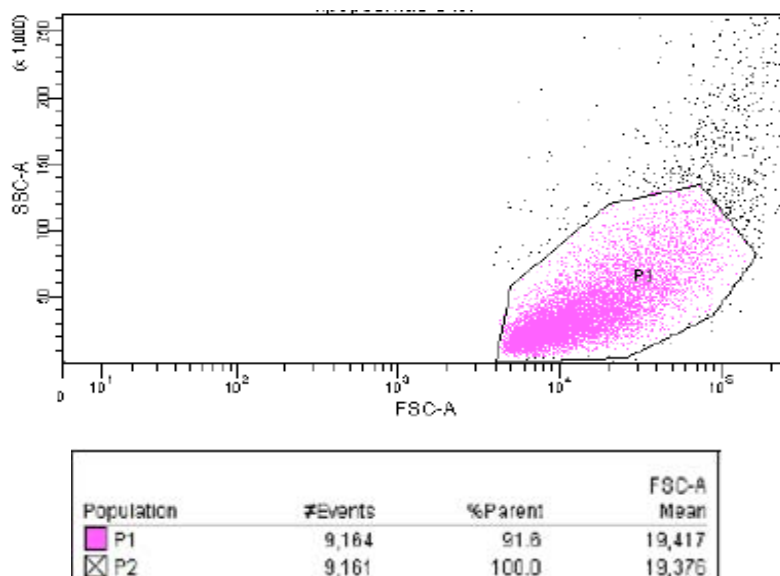


Figura 4A

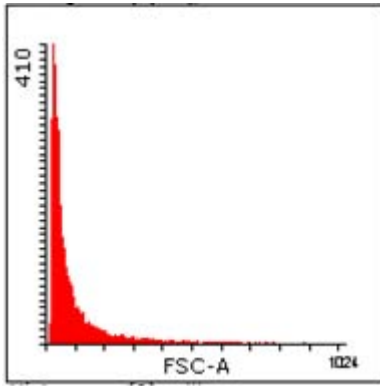


Figura 4B

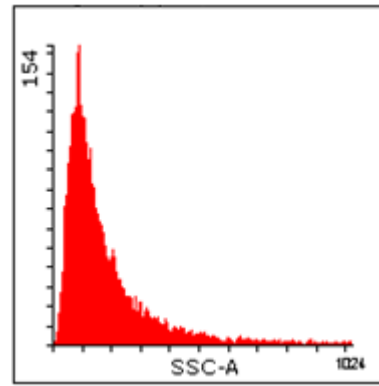
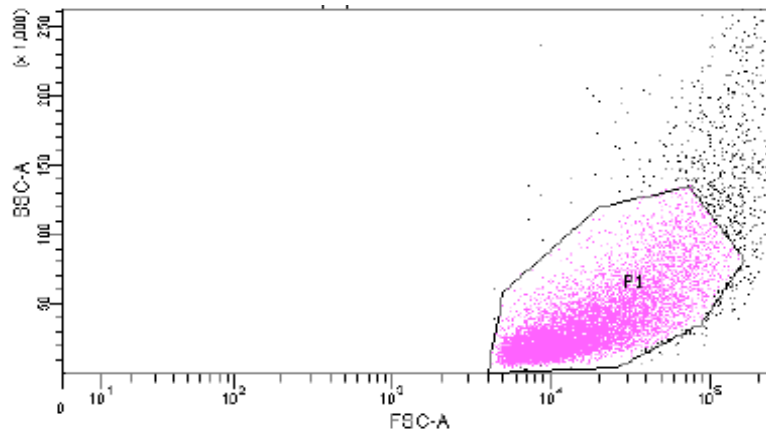


Figura 4C

Figura 4. Figura control o tiempo cero de gel en el buffer idóneo (concentración ideal de agente gelificante). Se utilizó gel con el buffer idóneo en la mejor concentración y se muestra una de las temperaturas de congelación. A) Gráfica de puntos que relaciona tamaño y complejidad de las vesículas dentro del gel, B) Histograma del tamaño relativo de los liposomas y C) Complejidad relativa de los liposomas.



Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean
P1	8,996	90.0	23,132
P2	0,990	99.9	23,049

Figura 5A

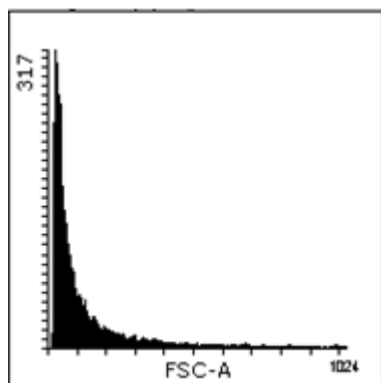


Figura 5B

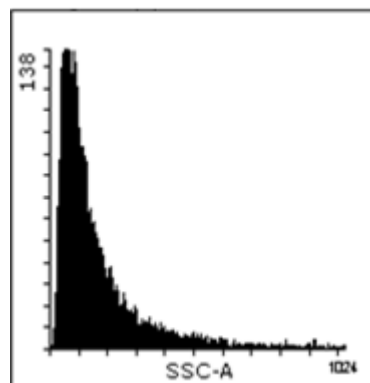


Figura 5C

Figura 5. Figura evaluada al sexto mes de gel en el buffer idóneo (concentración ideal de agente gelificante). Se utilizó el gel en el buffer idóneo en la mejor concentración y se muestra una de las temperaturas de congelación. A) Gráfica de puntos que relaciona tamaño y complejidad de las vesículas dentro del gel, B) Histograma del tamaño relativo de los liposomas y C) Complejidad relativa de los liposomas.

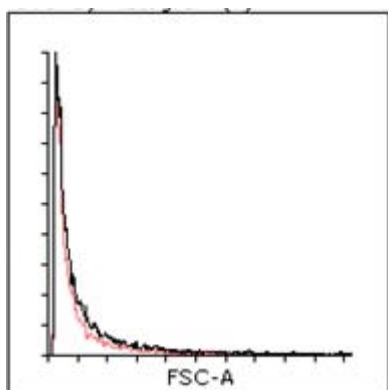


Figura 6A

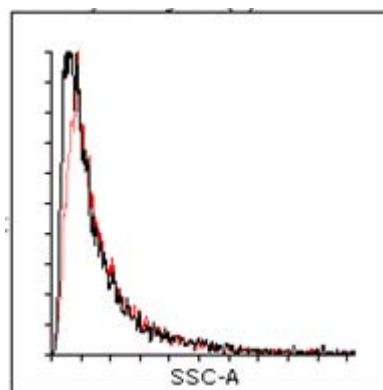


Figura 6B

Figura 6. Figura de superposición de histogramas (concentración ideal de agente gelificante). Se realizó la superposición de histogramas de gel en el buffer idóneo al inicio y al sexto mes de evaluación en la mejor concentración y mostrando una de las temperaturas de congelación. A) Histograma de superposición del tamaño relativo de los liposomas y B) Histograma de superposición de la complejidad relativa de los liposomas.

9. 3 Evaluación de geles por Microscopia Electrónica de Transmisión

Para evaluar la morfología e integridad de los liposomas presentes en los sistemas farmacéuticos antes mencionados, se hizo uso de la microscopia electrónica de transmisión.

La evaluación inicial de las vesículas que conforman el sistema mostró una forma semicircular con circunferencia delimitada en los geles con los distintos vehículos y a las diferentes concentraciones de agente gelificante (Figura 7 y 8) y posteriormente durante el estudio de estabilidad las micrografías indicaron que solo en una de las concentraciones de agente gelificante en agua miliQ y en el buffer idóneo fueron estables, es decir, presentaron las mismas características morfológicas hasta por tres y seis meses respectivamente (Figura 9 y 10). En cuanto a las temperaturas utilizadas no hubo diferencias.

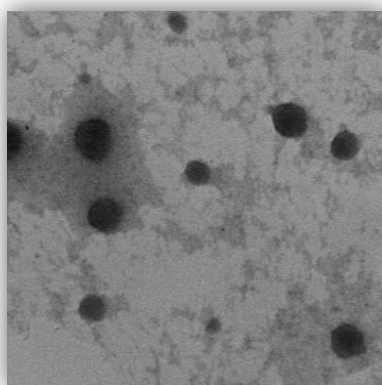


Figura 7. Población inicial de liposomas con IL-2 en gel de agua miliQ (concentración ideal de agente gelificante). Técnica de tinción negativa, lectura por microscopía electrónica de transmisión, 80K.

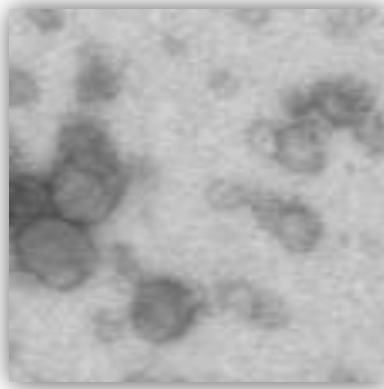


Figura 8. Población inicial de liposomas con IL-2 en el gel con el buffer idóneo (concentración ideal de agente gelificante). Técnica de tinción negativa, lectura por microscopía electrónica de transmisión, 80K.

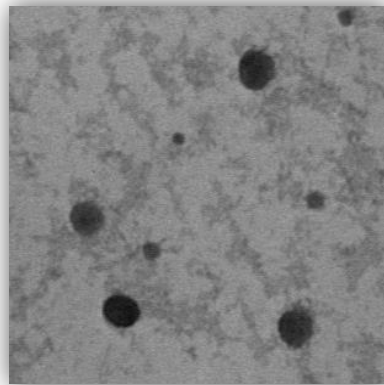


Figura 9. Población final de liposomas con IL-2 en gel de agua miliQ (concentración ideal de agente gelificante). Evaluación del sistema una vez transcurridos tres meses. Técnica de tinción negativa, lectura por microscopía electrónica de transmisión, 80K.

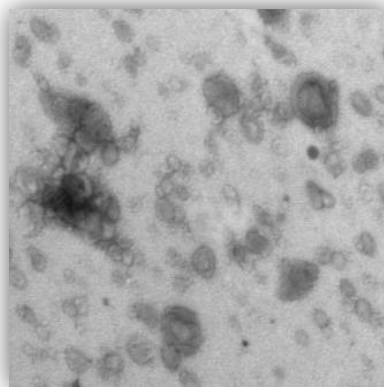


Figura 10. Población final de liposomas con IL-2 en gel con el buffer idóneo (concentración ideal de agente gelificante). Evaluación del sistema una vez transcurridos seis meses. Técnica de tinción negativa, lectura por microscopía electrónica de transmisión, 80K.

9.4 Evaluación de la actividad biológica de la IL-2 mediante ELISA

Una vez que se evaluó la estabilidad de los liposomas con diferentes concentraciones de gel en agua o en el buffer idóneo, se procedió a evaluar la presencia de IL-2 contenida y/o en la superficie de los liposomas mediante un ensayo de ELISA validado en nuestro laboratorio. Primero se procedió a cuantificar la concentración de IL-2 expuesta en la superficie de los liposomas, para lo cual se usó una suspensión del sistema liposomal; después se procedió a lisar los liposomas para evaluar la IL-2 total, es decir, la expresada en la membrana liposomal y la encapsulada en la vesícula. Finalmente por resta de la superficial a la total, se obtuvo la cantidad encapsulada. Para la evaluación de la cantidad acarreada por las partículas solo se utilizó el valor de la Interleucina dos total por lo que las diferenciales de la expuesta y la encapsulada no se muestran.

Para poder calcular la concentración de IL-2 de todas las muestras procesadas, fue necesario construir una curva estándar, la cual se realizó con un patrón de rhIL-2 por triplicado de acuerdo a la *Guidance for Industry Bioanalytical Methods Validation for Human Studies*.

9.4.1. Curva estándar para la cuantificación de interleucina 2

Al término de la realización de la curva estándar para la cuantificación de IL-2 contenida en los sistemas farmacéuticos, se elaboró una tabla (Tabla 3) donde se muestran las absorbancias obtenidas a 450 nm y 570 nm de las diluciones. A continuación se restaron las absorbancias obtenidas a 570nm de las obtenidas a 450 nm, para eliminar posibles errores provocados por imperfecciones ópticas presentes en la placa (Tabla 4) y por último se hizo la corrección del blanco (Tabla 5) y se graficó y calculó la ecuación de la recta (Figura 11).

Tabla 3. Lecturas de Absorbancias.

Concentración ng/mL	ABS a 450 nm			ABS a 570 nm		
	0.125	0.059	0.057	0.057	0.045	0.042
0.25	0.066	0.066	0.065	0.046	0.046	0.044
0.5	0.072	0.071	0.072	0.045	0.044	0.044
1	0.089	0.091	0.091	0.043	0.044	0.042
2	0.133	0.134	0.127	0.047	0.045	0.045
4	0.19	0.184	0.195	0.046	0.044	0.047

Tabla 4. Resta de Absorbancias (450 nm – 570 nm).

Concentración ng/mL	Corrección (ABS a 450 nm – ABS a 570 nm)			Promedio	S	CV
	0.125	0.014	0.015			
0.25	0.02	0.02	0.021	0.02033	0.0005	2.8394
0.5	0.027	0.027	0.028	0.02733	0.0005	2.1122
1	0.046	0.047	0.049	0.04733	0.0015	3.2271
2	0.086	0.089	0.082	0.08566	0.0035	4.0994
4	0.144	0.14	0.148	0.144	0.004	2.7777

Tabla 5. Corrección de Absorbancia – Blanco.

Concentración ng/mL	Corrección ABS – Blanco (0.008)			Ecuación de la recta
0.125	0.006	0.007	0.006	$Y=0.0337x + 0.0043$ $r^2 = 0.9939$
0.25	0.012	0.012	0.013	
0.5	0.019	0.019	0.02	
1	0.038	0.039	0.041	
2	0.078	0.081	0.074	
4	0.136	0.132	0.14	

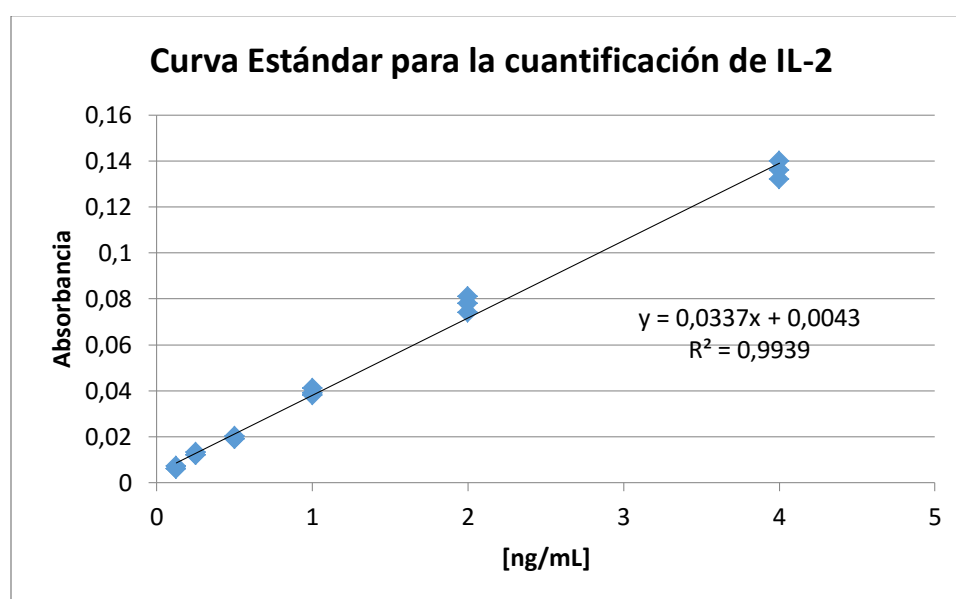


Figura 11. Curva estándar de IL-2 para la cuantificación de IL-2 contenida en los distintos sistemas farmacéuticos en estudio. Para su realización, se prepararon diluciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 ng/mL con un patrón de rhIL-2 por triplicado de acuerdo a la *Guidance for Industry Bioanalytical Methods Validation for Human Studies*.

De acuerdo con la *Guidance for Industry Bioanalytical Methods Validation for Human Studies*, que establece que el coeficiente de determinación para métodos biológicos es de $r^2 \geq 0.95$, la curva estándar obtenida puede ser usada para la determinación de la IL-2 presente en los sistemas en estudio.

9.4.2. Determinación de IL-2 en el sistema farmacéutico.

Una vez obtenida la curva estándar se procedió a cuantificar la cantidad de IL-2 contenida en los liposomas correspondientes a los geles con agua miliQ y al buffer idóneo a la concentración ideal de agente gelificante y a las distintas temperaturas de congelación, la cual involucra la expresada en la membrana y la encapsulada en la vesícula. Este 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 de metodología.

Los resultados indicaron que todas las concentraciones del gel en agua miliQ fueron estables, sin embargo solo en una el sistema conservó la cantidad mínima requerida de IL-2 para lograr el efecto terapéutico deseado, especificada en la patente concedida con número de registro 330174 (60 UI/mL) hasta los 3 meses, ya que al 4to mes realizada la evaluación, se obtuvo una concentración de IL-2 total de 52.3127 UI/mL, 48.9877 UI/mL y 46.1377 UI/mL para cada una de las temperaturas seleccionadas en este estudio respectivamente con respecto a la inicial, la cual fue de 79.3871 UI/mL, 76.5371 UI/mL y 78.4371 UI/mL respectivamente, habiendo una disminución de 34.1043 %, 35.9949 % y 41.1788 % para cada temperatura.

En cuanto a los resultados obtenidos en todas las concentraciones del gel en el buffer idóneo mostraron que fueron estables, sin embargo solo en una el sistema conservó la cantidad mínima requerida de IL-2 para lograr el efecto terapéutico deseado, hasta los 6 meses, ya que al 7mo mes realizada la evaluación, se

obtuvo una concentración de IL-2 Total de 53.2608 UI/mL, 51.3600 UI/mL y 53.2608 UI/mL para cada una de las temperaturas seleccionadas en este estudio respectivamente con respecto a la inicial, la cual fue de 73.2096 UI/mL, 71.7840 UI/mL y 69.8832 UI/mL respectivamente, habiendo una disminución de 25.8041 %, 26.506 % y 27.2489 % para cada temperatura.

10. Análisis de Resultados

La síntesis del espermidil-colesterol se realizó en el laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ en la FES- Zaragoza, sin embargo fue una modificación del proceso de síntesis que lleva a cabo el Dr. Miguel Ángel Antonio Ibáñez Hernández en la ENCB del IPN, quien orientó en la realización de la misma. El lípido obtenido se comparó con un estándar de referencia de espermidil-colesterol, revelándose por cromatografía, que el lípido sintetizado fue el espermidil-colesterol, debido a que el Rf tanto del estándar como de la muestra presentaron el mismo valor, y de igual forma, el lípido que se obtuvo exhibió físicamente las mismas propiedades de apariencia y olor que el estándar, otra prueba que indicó que el lípido sintetizado fue 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, e Isabel Baeza Ramírez.

Una vez fabricados los liposomas para los distintos sistemas farmacéuticos en estudio, se suspendieron en los geles formulados con agua miliQ y el buffer idóneo; las evaluaciones iniciales, es decir, antes de someter las muestras a las diferentes temperaturas para el estudio de estabilidad, en las formulaciones, indican que se tienen liposomas semicirculares con circunferencia delimitada, de complejidad y tamaño homogéneo. Los liposomas contenidos en los geles

preparados con agua miliQ presentaron mayor complejidad al ser evaluados por citometría de flujo, lo que pudiera implicar la posibilidad de que posean mayor cantidad de IL-2 expuesta (en la membrana liposomal), lo que se confirma en la cuantificación inicial mediante el inmunoensayo ELISA donde se detecta aproximadamente 15% más IL-2 en la superficie de los liposomas (datos no mostrados).

Conforme se llevó a cabo la evaluación mensual para los sistemas en estudio, se podía observar que cierta cantidad de los liposomas con el paso del tiempo se aglutinaba, denotado en la sobreposición de los histogramas (del inicial con el correspondiente a cada evaluación mensual), las micrografías apoyaban esta detección de la aglutinación, mostrando zonas de vesículas íntegras y conformes a la morfología inicial y zonas de aglutinación de partículas ovaladas y deformes. Por su parte, la evaluación de la cantidad de IL-2 detectada por ELISA iba disminuyendo probablemente por problemas de homogeneidad causadas por la migración de los liposomas a zonas de aglutinación.

Al término de la evaluación del 4to y 7mo mes para los sistemas en estudio, siendo Agua miliQ y el buffer idóneo respectivamente; se observó descenso en la población en cada una de las muestras, no mayor al 15 % con respecto a la cantidad inicial de eventos, debido probablemente a su desintegración y de igual forma se observó aglutinación de las vesículas que no supero en algún momento a la evaluación inicial. En cuanto a la cuantificación de IL-2, en las muestras en gel a base de agua miliQ, se notó disminución en la cantidad de IL-2 inicial con respecto al cantidad cuantificada al término del 4to mes, la cual fue de 34.1043 %, 35.9949

% y 41.1788 % para las temperaturas de -4°C , -13°C , -19°C respectivamente y para las muestras en gel en el buffer idóneo, al 7mo mes, una disminución de IL-2 del 25.8041 %, 26.506 % y 27.2489 % para las temperaturas de -4°C , -13°C , -19°C respectivamente. El hecho de que el buffer idóneo los mantenga estables por más tiempo hace pensar que la regulación del pH es necesaria para mantener tanto la integridad de las partículas como la actividad biológica de la Interleucina; aunado a lo anterior, el gel preparado en el buffer es menos viscoso lo que puede permitir una mejor distribución de las partículas contenidas.

Nuestros resultados indican que los sistemas farmacéuticos tienen la capacidad de permanecer dentro de las especificaciones establecidas en la patente concedida con número 330174 (60 UI de IL-2/mL), durante 3 meses en el caso del gel a base de agua miliQ y 6 meses en el gel con el buffer idóneo, ambos a la concentración ideal de agente gelificante.

Así mismo, los resultados obtenidos mostraron que la concentración ideal de agente gelificante en ambas formulaciones es menor al 2% y mayor a 0.25 % p/v, dado que a concentraciones menores a 0.25% de agente gelificante se necesita adicionar una cantidad excesiva de trietanolamina para la formación del gel, lo que ocasiona una considerable modificación del pH, alejándolo por mucho del pH óptimo en el cual los liposomas se mantienen viables. Por otro lado, a una concentración mayor al 2% y al ser los liposomas nanopartículas, pueden alojarse dentro de la red tridimensional que conforma al gel favoreciendo su aplastamiento y subsecuente colapso o desintegración por la alta viscosidad y el efecto de la red tridimensional.

11. Conclusiones

Se optimizó un sistema farmacéutico que comprende liposomas con IL-2 en gel mostrando que en el buffer adecuado y en la concentración ideal de agente gelificante mantienen una estabilidad de seis meses.

Se sintetizó con éxito espermidil-colesterol necesario para la fabricación de los liposomas.

La presencia del buffer adecuado es necesaria para proporcionarle una mayor estabilidad al sistema.

La concentración de agente gelificante es determinante para la estabilidad de los liposomas y la ideal es menor al 2% p/v.

12. Referencias

1. Coombs J. Diccionario de Biotecnología. España: Editorial Labor, Ministerio de Educación y Ciencia; 1989.
2. Secretaría de Educación Pública. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Biotecnología Moderna para el desarrollo de México en el siglo XIX: Retos y Oportunidades, S.N.E. México: Editorial CONACYT-SEP; 2001.
3. Toledo P, Guzmán C. Las Nanotecnologías: Un paradigma tecnológico emergente. Dinámica y Especialización de la Innovación en las Nanotecnologías. Razón y Palabra. ISSN; 2008.
4. Bangham. "A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids. Nature. Vol. 23; 1961.
5. Bangham, "Membrane models with phospholipids".ProgBiophysMol Biol. 1968.
6. Torello M, Viscasillas A, Del Pozo A. Unidad de tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Vol. 21; 2002.
7. Webster T. Safety of nanoparticles from manufacturing to medical applications [libro electrónico]. New York: Springer Science + Business Media, LLC; 2009 [Consultado: 8 de septiembre de 2014]. Available from: <http://books.google.com.mx/books?id=CfGbTm6pouUC&pg=PA223&dq=liposome+s+applications&hl=en&sa=X&ei=iDsJVKeclShyASHkoKACg&ved=0CCEQ6AEwATgK#v=onepage&q=liposomes%20applications&f=false>
8. Ruano A. M. Fabricación de liposomas y cápsulas poliméricas [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas; 2013.
9. Pan D. Nanomedicine: A Soft Matter Perspective. Florida: Taylor & Francis Group; 2014.
10. Aulton M. Farmacia la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2ª ed. Reino Unido: Elsevier; 2004.
11. Gibson M. Pharmaceutical preformulation and formulation a practical guide from candidate drug selection to comercial dosage form.USA.:CRC Press; 2001.
12. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonized tripartite guideline. Pharmaceutical development Q8 (R2). 2009.
13. Lachman L, Lieberman H. The theory and practice of the industrial pharmacy. 3a ed. U.S.A.: Lea and Febinger; 1989.
14. Banker G, Rhodes C. Modern pharmaceuticals. 2a ed. U.S.A:Merrel Dekker; 1990.
15. Ahuja S, Scypinki S. Handbook of modern pharmaceutical analysis. U.S.A.: Academic Press. 2001.
16. Diario Oficial de la Federación. NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos.
17. Avila P, Madero I, López C, León F. Fundamentos de Criopreservación. Colombia: Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 57 No. 4; 2006.
18. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11ª ed. México: Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; 2014.
19. Remington G. Farmacia. 20ª ed. U.S.A.: Médica Panamericana Tomo I y II; 2000.
20. Guarango J. Geles. [en línea].2011. [Fecha de consulta 3 de Septiembre 2015]. Disponible en: <http://es.escribd.com/doc/52940200/geles1>.
21. Lieberman H, Rieger M, Bankel G. Pharmaceutical dosage forms: disperse systems. 2a ed. New York: Dekker Vol. II; 1996.

22. Paruta E. Emulsiones geles, Influencia de la formulación y fracción de fase dispersada sobre sus propiedades reológicas y estabilidad. [en línea]. Venezuela; 2008. [Fecha de consulta 3 de Septiembre 2015]. Disponible en: http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/08_MS_paruta_E.pdf.
23. Backlund S, Eriksson F, Rantala M, Varho K. Composiciones farmacéuticas derivadas de geles basados en microemulsiones, método para su preparación y nuevos geles basados en microemulsiones. España; 2001.
24. Jones D. Pharmaceutics-dosage form and design. London: Pharmaceutical Press; 2008.
25. Instituto Nacional del Cáncer. ¿Qué es el cáncer? [en línea]. [Actualizada 7 de marzo de 2014]. [Fecha de consulta: 24 enero 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.
26. Chicharro L, Mojares L. Fisiología Clínica del Ejercicio. Buenos Aires: Editorial Panamericana. 2008
27. 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>
28. Instituto Nacional del Cáncer. Cáncer de cuello uterino. [en línea]. [Actualizada 24-diciembre-2014]. [Fecha de consulta: 25 enero 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino>
29. Cámara de diputados. H. Consejo de la unión LXII legislatura. Boletín 4872. Cáncer, tercera causa de muerte en México; más de 128 mil casos cada año. [en línea]. [Actualizada 24 de diciembre 2014]. [Fecha de consulta: 25 de enero 2014]. Disponible en: <http://www5.diputados.gob.mx/index.php/esl/Comunicacion/Boletines/2014/Diciembre/24/4872-Cancer-tercera-causa-de-muerte-en-Mexico-mas-de-128-mil-casos-cada-ano>
30. 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>.
31. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Parkin. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.
32. Fuente J, Ferrandiz C. La piel en el contexto de la medicina y sus especialidades efectos adversos cutáneos secundarios al tratamiento con interleucina 2. Barcelona: Badalona; 2003.
33. Lorusso, M.P., aukerman, L.S., Polin, L., Redman, G.B., Valdivieso, M., Biernat, L. y Corbett, H.T. 1990. Antitumor Efficacy of Interleukin-2 Alone and in Combination with Adriamycin and Dacarbazine in Murine Solid Tumor Systems. *Cancer Research* 50:5876-5882.
34. Szoka Fisher, Kefer C, Fisher R, Ellis T. A phase I trial of continuous infusion interleukin-4 (IL-4) alone and following interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. *Annals Oncol*; 1994.
35. Szoka F, Papahadjopoulos D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann Rev Biophys Bioeng*; 1980.
36. Smith. Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications. *Science*; 1988.
37. Ardizzoni A, Bonavia M, Viale M, Baldini E, Mereu C, Verna A, Ferrini S, Cinquegrana A., Molinari S, Roest J, Sharenberg, J. Biologic and Clinical Effects of

- Continuous Infusion Interleukin-2 in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer; 1994.
38. Becker, C.J., Pancook, D.J., Gillies, D.S., Furukawa, K. y Reisfeld, A.R. 1996a. T Cell-mediated Eradication of Murine Metastatic melanoma Induced by Targeted Interleukin 2 Therapy. *J. Exp. Med.*; 1996.
 39. Ciacci C, Mahida R, Dignass A, Koizumi, M, Podolsky K. Functional Interleukin-2 Receptors on Intestinal Epithelial Cells. *J. Clin. Invest.*; 1993.
 40. Vagge, J., Barberá-Gillem, E., Abra, R., Huang, A., Working, P. 1994. Tissue distribution and therapeutic effect of intravenous free or encapsulated liposomal doxorubicin on human prostate carcinoma xenografts. *Cancer*; 1994.
 41. Meager. *The Molecular Biology of Cytokines*. John Wiley & Sons. England; 1998.
 42. Mire A. Thorpe R. *Cytokines*. Academic Press Great Britain; 1998.
 43. Craiu A, Barouch H, Zheng X, Kuroda J, Schmitz E, Lifton A, Steenbeke T, Nickerson E. An IL-2/Ig Fusion Protein Influences CD4+ T Lymphocytes in Naïve and Simian Immuno deficiency Virus-Infected Rhesus Monkeys. *AIDS Research and Human Retroviruses*; 2001.
 44. United States National Library of Medicine. ChemIDplus. ToxNet. [Fecha de consulta: 12 de Septiembre 2015] Disponible en: <http://www.chem.sis.nlm.gov/chemisplus/proxyservit>.
 45. Paul Schwander, Oficina Europea de Patentes, La Haya. Las búsquedas sobre el estado de la técnica: una obligación para las PYMES innovadoras. [en línea]. [Fecha de consulta: 25 de enero 2015]. Disponible en: http://www.wipo.int/sme/es/documents/prior_art.htm
 46. Instituto Nacional de Propiedad Industrial. Búsqueda del Estado de la Técnica, patentes de invención y modelos de utilidad. [en línea] Gobierno de Chile. [Actualizado en septiembre del 2014]. [Fecha de consulta: 26 de enero 2015]. Disponible en: http://www.inapi.cl/portal/institucional/600/articulos-979_recurso_1.pdf
 47. 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 [Fecha de consulta: 9 de septiembre de 2014]. Disponible en: http://www.gbcbiotech.com/en/imagenes/biotecnologia/33BioTecnologia_mexico.pdf