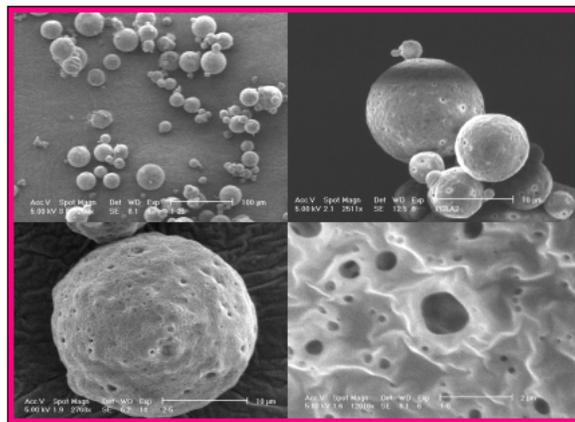


Universidad de La Habana

“Microesferas de copolímeros de ácido láctico y glicólico cargadas con interferón alfa 2b y factor de crecimiento epidérmico: Obtención, caracterización y estudios de liberación”



Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Químicas

Autor: MSc. Vivian María Saez Martínez

Tutores: Dr. Cs. Carlos Peniche Covas

Dr. Rolando Páez Meireles

Resumen

Los péptidos y proteínas son biomoléculas con elevado potencial terapéutico por lo que muchas de ellas se han convertido en principios activos de medicamentos utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, su corto tiempo de vida media en el organismo, la generación de efectos adversos y la presencia de inmunogenicidad en algunos casos, constituyen importantes desventajas que han condicionado la búsqueda de nuevos sistemas de liberación de estos biofármacos. Entre ellos las microesferas poliméricas constituyen una alternativa muy estudiada ya que puede brindar ventajas tales como la reducción de la frecuencia de administración, disminución de la dosis total del fármaco requerida para un tratamiento y reducción potencial de los efectos adversos. En Cuba se producen varios principios activos de esta naturaleza, como el interferón alfa 2b (IFN- α 2b) y el factor de crecimiento epidérmico (FCE), cuya inclusión en un sistema de liberación basado en microesferas resulta de gran interés. Actualmente no existe en el mercado ningún producto con IFN- α 2b o FCE microencapsulados y, aunque existen algunos trabajos relacionados con la encapsulación de estas biomoléculas en matrices derivadas de ácido láctico y glicólico (PLGAs), no están definidas de forma general las condiciones de encapsulación que permitan obtener un sistema con las características adecuadas para estas proteínas. En este trabajo se evaluó la microencapsulación del IFN- α 2b y el FCE con el objetivo de obtener sistemas de liberación modificada de estas proteínas que sean de utilidad para el desarrollo de un producto biofarmacéutico de avanzada. Como resultado del estudio de la microencapsulación de estas proteínas se obtuvo la relación entre algunos parámetros experimentales y las características de las micropartículas lo que permite diseñar *a priori* el proceso de encapsulación según las características deseadas para las microesferas de IFN- α 2b y FCE. Se demostró que las características intrínsecas de las proteínas encapsuladas y principalmente su carácter hidrofóbico ejercen un efecto muy importante en las propiedades del sistema obtenido, hasta el punto de definir su utilidad práctica, como en el caso del IFN- α 2b que a causa de sus interacciones con la matriz experimenta una liberación incompleta de las partículas y además sufre modificaciones en sus propiedades. En cambio, el FCE pudo ser encapsulado conservando sus propiedades. Se demostró además que la encapsulación de ambas proteínas modifica el comportamiento de la concentración sérica de las mismas cuando son administradas en conejos por la vía subcutánea con respecto a su aplicación sin encapsular. Se probó el efecto cicatrizante del FCE liberado de las microesferas al ser administradas en heridas de grosor total en ratas.

Abreviaturas

aa – aminoácidos

ADN – ácido desoxirribonucleico

ANOVA – análisis de varianza

DCM – diclorometano

EDTA – Ácido etilendiamino tetraacético

EE – eficiencia de encapsulación

ELISA – ensayo inmunoenzimático en fase sólida

FCE – Factor de crecimiento epidérmico humano recombinante

FTIR – Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier

IFN- α 2b – Interferón alfa 2b humano recombinante

PBS – solución tampón fosfato salino, pH 7,2

PEG – Polietilenglicol

PLA – poli (ácido láctico)

PLGA – poli (ácido láctico-co-glicólico)

PLGAs – polímeros derivados de ácido láctico y ácido glicólico

PVA – alcohol polivinílico

Q – carga de las microesferas

RP-HPLC – cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

SDS – Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE – electroforesis en gel plano de poliacrilamida con SDS

SEM – Microscopía electrónica de barrido

THF – tetrahidrofurano

w/o/w – agua-en-aceite-en-agua

Índice

1	Introducción	1
2	Revisión Bibliográfica	6
2.1	Las proteínas como agentes terapéuticos	6
2.1.1	Interferón alfa-2b	9
2.1.2	Factor de Crecimiento Epidérmico	10
2.2	La microencapsulación de proteínas terapéuticas.....	11
2.2.1	La microencapsulación.....	11
2.2.2	Técnicas más empleadas para microencapsular péptidos y proteínas.....	13
2.2.3	Caracterización de microesferas cargadas con proteínas	15
2.2.4	Caracterización de las proteínas encapsuladas	20
2.2.5	Estabilidad de las proteínas frente al proceso de encapsulación. Estrategias de estabilización	21
2.3	Microesferas de PLGAs cargadas con IFN- α 2b.....	26
2.4	Microesferas de PLGAs cargadas con FCE	28
2.5	Consideraciones finales.....	29
3	Materiales y Métodos	31
3.1	Materiales	31
3.2	Procedimiento de encapsulación.....	31
3.2.1	Variante 1	31
3.2.2	Variante 2	32
3.3	Caracterización de las microesferas de IFN- α 2b y FCE.....	33
3.3.1	Morfología.....	33
3.3.2	Tamaño de las partículas	33
3.3.3	Carga y eficiencia de encapsulación	33
3.3.4	Perfil de liberación	34
3.4	Efecto de las variables experimentales del proceso de encapsulación en las características de las microesferas obtenidas	34
3.4.1	Efecto de la concentración de la proteína y volumen de la fase acuosa interna.....	34
3.4.1.1	Sobre la carga y la eficiencia de encapsulación	34
3.4.1.2	Sobre el tamaño de las partículas	34
3.4.2	Influencia de la velocidad de agitación de la segunda emulsión.....	35
3.4.3	Efecto del modo de preparar la primera emulsión.....	35
3.5	Efecto de la naturaleza de los componentes del sistema en las características de las microesferas obtenidas.....	35

3.5.1	El carácter hidrofóbico de la proteína encapsulada	35
3.5.1.1	Factores que influyen en la liberación incompleta del IFN- α 2b.....	36
3.5.1.2	Efecto de la variación de la hidrofobicidad del FCE y el IFN- α 2b sobre las propiedades de las microesferas.....	37
3.5.2	Las propiedades de la matriz de encapsulación.....	38
3.5.3	Efecto de aditivos co-encapsulados	39
3.6	Evaluación de la utilidad de las microesferas obtenidas para el desarrollo de formulaciones de liberación modificada	40
3.6.1	Caracterización de las proteínas encapsuladas	40
3.6.1.1	Extracción por precipitación	40
3.6.1.2	Extracción mediante un sistema de dos fases líquidas no miscibles	41
3.6.2	Evaluación <i>in vivo</i> de las microesferas cargadas con IFN- α 2b y FCE	43
3.6.2.1	Interferón alfa-2b.....	43
3.6.2.2	FCE.....	43
3.7	Técnicas analíticas empleadas en la evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del IFN- α 2b y el FCE.....	44
3.7.1	Cuantificación de Interferón alfa-2b y FCE por microBCA	44
3.7.2	Cuantificación de Interferón alfa-2b por ELISA.....	45
3.7.3	Cuantificación de FCE por ELISA	45
3.7.4	Electroforesis de IFN- α 2b en gel plano de poliacrilamida	46
3.7.5	Análisis de IFN- α 2b y FCE mediante RP-HPLC.....	46
3.7.6	Actividad biológica del IFN- α 2b.....	46
3.7.7	Actividad biológica del FCE	47
3.8	Análisis estadístico.....	47
4	Resultados y Discusión.....	48
4.1	Efecto de las variables experimentales del proceso de encapsulación en las características de las microesferas obtenidas	50
4.1.1	Efecto de la concentración de la proteína y volumen de la fase acuosa interna.....	50
4.1.1.1	Sobre la carga y la eficiencia de encapsulación	50
4.1.1.2	Sobre el tamaño de las partículas	54
4.1.2	Influencia de la velocidad de agitación de la segunda emulsión.....	55
4.1.3	Efecto del modo de preparar la primera emulsión.....	56
4.2	Efecto de la naturaleza de los componentes del sistema en las características de las microesferas obtenidas.....	58
4.2.1	El carácter hidrofóbico de la proteína encapsulada	58
4.2.1.1	Diferencias en la carga y la eficiencia de encapsulación.....	59
4.2.1.2	Diferencias en el perfil de liberación.....	60

4.2.1.3	Factores que influyen en la liberación incompleta del IFN- α 2b.....	61
4.2.1.4	Efecto de variar la hidrofobicidad del FCE y el IFN- α 2b sobre las propiedades de las microesferas.....	68
4.2.2	Las propiedades de la matriz de encapsulación.....	73
4.2.2.1	Influencia de la proporción de ácido láctico en el polímero.....	73
4.2.2.2	Efecto de la masa molecular del polímero.....	75
4.2.2.3	Efecto del grupo final.....	75
4.2.3	Efectos de los aditivos co-encapsulados con la proteína.....	76
4.3	Evaluación de la utilidad de las microesferas obtenidas para el desarrollo de formulaciones de liberación modificada.....	80
4.3.1	Caracterización de las proteínas encapsuladas.....	80
4.3.1.1	Extracción del IFN- α 2b encapsulado por precipitación.....	81
4.3.1.2	Extracción del IFN- α 2b encapsulado mediante un sistema de dos fases líquidas no miscibles.....	85
4.3.1.3	Extracción del FCE encapsulado mediante un sistema de dos fases líquidas no miscibles ..	92
4.3.2	Otras propiedades de las microesferas.....	97
4.3.3	Evaluación in vivo de las microesferas cargadas con IFN- α 2b y FCE.....	97
4.3.3.1	Interferón alfa-2b.....	97
4.3.3.2	Factor de Crecimiento Epidérmico.....	98
5	Conclusiones.....	100
6	Recomendaciones.....	101
7	Referencias.....	102
Anexos	114	
Anexo 1:	Ajuste de los perfiles de liberación de IFN- α 2b y FCE a distintos modelos.....	114
Anexo 2:	Cálculo del área superficial hidrofóbica a partir de los valores determinados para los modelos estructurales del FCE de 51 aa y el FCE de 52aa.....	118
Anexo 3:	Selección de la fase acuosa del sistema de extracción para la caracterización del IFN- α 2b encapsulado. Análisis estadístico.....	120
Anexo 4:	Selección de la fase acuosa del sistema de extracción para la caracterización del FCE encapsulado. Análisis estadístico.....	122
Anexo 5:	Evaluación de otras propiedades que deben tener las microesferas para ser incluidas en un producto biofarmacéutico.....	124

1 Introducción

En las últimas tres décadas los productos farmacéuticos basados en péptidos y proteínas han ganado particular importancia en el tratamiento de diversas enfermedades. Sus principales ventajas radican en la especificidad de su acción en el organismo y su tolerabilidad. El surgimiento de la era biotecnológica con los avances en la tecnología del ADN recombinante ha hecho posible el desarrollo de procesos de producción eficientes y capaces de proveer grandes cantidades de estas biomoléculas con una pureza excepcional, óptimas para el diseño de productos biofarmacéuticos (1). Actualmente existen varias proteínas que se utilizan como principios activos de diversas formas farmacéuticas que se venden en el mercado internacional, entre ellas se encuentran la insulina, la hormona de crecimiento, los interferones (α , β y γ), la eritropoyetina, el factor estimulador de colonias de granulocitos, la estreptoquinasa y los factores de crecimiento.

Sin embargo, las proteínas como agentes terapéuticos, presentan algunas limitaciones, por ejemplo su inestabilidad físico-química en algunos fluidos corporales (ej.: en la saliva y los jugos gástricos) lo cual limita el uso de algunas rutas de administración, como es el caso de la vía oral. Por otra parte, el gran tamaño de estas biomoléculas limita el uso de la vía transdérmica. Como consecuencia de esto la vía más utilizada para introducir las proteínas en el organismo es la parenteral. A los inconvenientes propios de esta vía, se adicionan otros inherentes al comportamiento de las proteínas como principio activo: *i*) corto tiempo de vida media en el organismo, lo cual conlleva a una alta frecuencia de administración; *ii*) generación de efectos adversos propios de su mecanismo de acción o de efectos colaterales indeseados y *iii*) presencia de inmunogenicidad en algunos casos (2-6).

Debido a las limitaciones mencionadas anteriormente se trabaja en la búsqueda de nuevos sistemas de administración que permitan aprovechar el potencial terapéutico de las proteínas con el mínimo de inconvenientes posible. Los tres sistemas que se han aplicado con mayor éxito a los péptidos y proteínas son: los basados en la modificación química de las biomoléculas (PEGilación) y los que se basan en la encapsulación de las moléculas en sistemas lipídicos (liposomas) o poliméricos (microesferas) (2, 7, 8).

La microencapsulación es una técnica que permite recubrir sustancias en estado sólido, líquido o gaseoso con una capa de material de diferente naturaleza generando un producto que invariablemente es un sólido. Las microesferas que contienen un fármaco pueden proporcionar ventajas tales como: *i*) disminución de la frecuencia de administración, lo que conlleva a una mayor aceptación por parte del paciente, *ii*) aumento del beneficio terapéutico debido a la eliminación de las fluctuaciones en los

niveles séricos del fármaco, *iii*) potencial disminución de la dosis total requerida para un tratamiento debido a una mayor eficiencia en el aprovechamiento de la dosis administrada y *iv*) potencial disminución de los efectos adversos ya que disminuye la cantidad del fármaco liberado en el organismo al momento de la aplicación (9, 10).

La microencapsulación de estas biomoléculas cobró auge desde finales de la década de los '80 cuando se aprobó por la “Administración de Drogas y Alimentos” (FDA, siglas en inglés) de los EE.UU. el primer producto de esta naturaleza: Lupron Depot. Esta formulación contiene un péptido (acetato de leuprolida) encapsulado en microesferas y sólo requiere ser administrada cada 3 ó 4 meses a pacientes que padecen cáncer de próstata. Sin embargo, sólo han llegado al mercado pocos productos de esta naturaleza (cuatro péptidos y una proteína) (2), lo cual se debe fundamentalmente a la fragilidad de estas biomoléculas cuyas propiedades se afectan durante la encapsulación, y a la complejidad del proceso de microencapsulación que hace muy difícil encontrar un procedimiento adecuado para obtener microesferas de una proteína terapéutica útil en el diseño formulaciones de liberación controlada.

Para microencapsular proteínas se ha usado fundamentalmente una familia de polímeros derivados del ácido láctico y glicólico (PLGAs) (10). Existe una gran cantidad de trabajos científicos dedicados a obtener microesferas con estos polímeros cargadas con péptidos y proteínas. La cantidad de variantes de los métodos de encapsulación empleados, las diferentes características de las matrices poliméricas disponibles, el uso de otros aditivos con disímiles propósitos y, sobre todo, la gran variedad en la naturaleza de las proteínas encapsuladas genera una gran diversidad en las propiedades de los sistemas obtenidos. En muchos de los trabajos publicados se evalúan características de las microesferas tales como el tamaño, el contenido de proteína y la liberación de la molécula encapsulada en el tiempo. También suelen publicarse estudios exploratorios *in vitro* o en modelos animales para encontrar evidencias de que el sistema diseñado funciona con el objetivo previsto. Sin embargo, se encuentran muy pocos trabajos en los que se evalúa de forma exhaustiva la conservación de las propiedades de la molécula una vez encapsulada. A pesar de esto es frecuente encontrar que las proteínas sufren efectos negativos en sus propiedades al ser encapsuladas en las matrices de PLGAs. Otro aspecto que a menudo observan los investigadores de este campo es la liberación incompleta de la proteína encapsulada. Estos dos aspectos resultan inaceptables para la aplicación de las microesferas de proteínas terapéuticas al desarrollo de productos biofarmacéuticos.

En Cuba se producen péptidos y proteínas recombinantes que constituyen principios activos de diversos productos farmacéuticos. Actualmente existe un gran interés en desarrollar sistemas novedosos de liberación para estas biomoléculas basados en microesferas poliméricas biodegradables

de matrices derivadas de ácido láctico y ácido glicólico. Ha existido particular interés en microencapsular interferón alfa 2b (IFN- α 2b) y factor de crecimiento epidérmico (FCE). El primero es una citocina cuya efectividad en el tratamiento de enfermedades virales como las hepatitis y varios tipos de cáncer ha sido ampliamente demostrada (11). Sin embargo la frecuencia de administración elevada, los largos tiempos de tratamiento y los efectos adversos asociados a su aplicación, han llevado a la búsqueda de sistemas de liberación modificada encaminados a reducir estas desventajas. Por su parte, el FCE se ha aplicado por la vía parenteral en úlceras del pie diabético con un resultado positivo importante en la prevención de la amputación de los miembros inferiores de estos pacientes. El tratamiento también es frecuente y aunque no es tan largo resulta incómodo para el paciente por la manipulación de las lesiones y la necesidad de realizarlo por personal especializado en una unidad asistencial. En tal sentido una formulación de liberación sostenida pudiera resultar ventajosa con respecto a la formulación existente.

Actualmente no existe en el mercado ningún producto con IFN- α 2b o FCE microencapsulados y, aunque existen algunos trabajos relacionados con la microencapsulación de estas biomoléculas en matrices de PLGAs, no están definidas de forma general las condiciones de encapsulación que permitan obtener un sistema con las características adecuadas para estas proteínas.

Por todo lo anterior como problema científico de este trabajo se plantea *que en el campo de la microencapsulación de proteínas terapéuticas en matrices poliméricas de PLGAs no existen generalizaciones que permitan obtener microesferas de IFN- α 2b y FCE con las características adecuadas en cuanto a carga, perfil de liberación y conservación de las propiedades de la proteína encapsulada, para una aplicación terapéutica sin la necesidad de realizar un estudio previo exhaustivo que conduzca a la elección del proceso de microencapsulación apropiado.*

Como hipótesis se planteó que *el estudio de la relación entre algunos parámetros de la microencapsulación, las características de las matrices de PLGAs empleadas y fundamentalmente las propiedades intrínsecas del IFN- α 2b y el FCE, con énfasis en su carácter hidrofóbico, con las cualidades de las partículas resultantes, permitirá encontrar las condiciones adecuadas para obtener microesferas cargadas con estas proteínas terapéuticas, útiles para el desarrollo de un producto biofarmacéutico de liberación modificada.*

Para comprobar la validez de la hipótesis se trazó como objetivo general: “Estudiar la obtención de microesferas de PLGAs cargadas de IFN- α 2b y FCE con potencialidades farmacéuticas mediante el análisis del efecto en las características de las micropartículas de las variables del proceso de

encapsulación, las propiedades de las proteínas y de la matriz polimérica” y los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la concentración de proteína, el volumen de la fase acuosa interna, el método de preparar la primera emulsión y la velocidad de agitación de la segunda emulsión sobre: la carga, la eficiencia de encapsulación, el tamaño de las partículas y el perfil de liberación.
- Determinar cómo influyen, en las características de las microesferas obtenidas, las propiedades de las proteínas encapsuladas, del polímero empleado y de aditivos utilizados durante la encapsulación.
- Encontrar un método que permita extraer al IFN- α 2b y FCE encapsulados en microesferas de polímeros del ácido láctico o copolímeros de este con el ácido glicólico para su caracterización físico-química y biológica. Analizar cómo afecta el proceso de encapsulación al IFN- α 2b y al FCE.
- Evaluar, mediante estudios *in vivo*, la utilidad práctica de las microesferas cargadas con IFN- α 2b y FCE obtenidas en este trabajo.

Como resultado de este trabajo se corroboraron resultados generales reportados por otros investigadores en cuanto al efecto de las variables del proceso de encapsulación sobre las características de las microesferas obtenidas, pero fue posible además encontrar las relaciones matemáticas entre estas variables y las características del producto específicamente para las microesferas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) cargadas con FCE. Este resultado permite la selección de las condiciones experimentales necesarias para obtener las microesferas con características específicas elegidas según cada aplicación concreta. Por otra parte se determinaron las causas de la liberación incompleta del IFN- α 2b encapsulado en estas matrices y el efecto de la hidrofobicidad de estas proteínas sobre las características de las microesferas obtenidas; este estudio no existía para el IFN- α 2b y el FCE. Lo mencionado anteriormente contribuye a ampliar el conocimiento de los aspectos teóricos de la microencapsulación de estas dos proteínas en matrices de PLGAs.

Otro aspecto novedoso fue hallar un procedimiento de extracción cuantitativo de las proteínas encapsuladas, útil para su adecuada caracterización físico-química y biológica. El mismo permitió demostrar el comportamiento diferente de las dos proteínas estudiadas frente al proceso de microencapsulación.

Una parte de los resultados recogidos en este trabajo permitió realizar los estudios que sustentan una patente, en la cual se reporta por primera vez la ventaja de la aplicación parenteral de microesferas de PLGAs con FCE para la prevención de la amputación del pie diabético. Esta patente se encuentra aprobada en Cuba, Europa y otros países.

Las microesferas cargadas con FCE constituyen un sistema adecuado para estudiar las ventajas que puede tener la liberación sostenida de esta proteína en la cicatrización de las úlceras del pie diabético con respecto a la liberación rápida del FCE contenido en la formulación del HeberProt.

Un aporte importante de este trabajo es que sienta las bases para el desarrollo en Cuba de la tecnología de microencapsulación de proteínas terapéuticas en matrices de PLGAs aplicables al desarrollo de productos biofarmacéuticos de avanzada.

2 Revisión Bibliográfica

2.1 Las proteínas como agentes terapéuticos

Por sus importantes funciones en el organismo, las proteínas han sido estudiadas como posibles agentes terapéuticos desde hace varias décadas. Sin embargo, no fue hasta el surgimiento de la era biotecnológica que las investigaciones cobraron auge debido al desarrollo de procesos de producción eficientes y capaces de proveer grandes cantidades de estas biomoléculas con una pureza excepcional, óptimas para el diseño de productos biofarmacéuticos (1).

Actualmente existen varias proteínas que se utilizan como principio activo de diversas formas farmacéuticas que se comercializan en el mercado internacional (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Ejemplos de proteínas terapéuticas que constituyen el principio activo de productos biofarmacéuticos que se encuentran disponibles en el mercado internacional.

Proteína	Producto	Compañía	Indicación
Eritropoyetina	1) Epogen	Amgen	Anemia asociada a fallo renal
Interferón alfa-2b	1) Intron A	Schering-Plough	Hepatitis C
	2) Heberon alfa R	HeberBiotec	Hepatitis B y varios tipos de cáncer
Interferón alfa-2a	1) Roferon A	Roche	Cáncer de pulmón, Hepatitis B, Sarcoma de Kaposi, Leucemia de células velludas
Interferón beta	1) Avonex	Biogen	Esclerosis Múltiple
Insulina	1) Humulin	Eli Lilly	Diabetes
Estreptoquinasa	1) Estreptasa	Aventis	Infarto agudo del miocardio
	2) Heberkinasa	HerberBiotec	Infarto agudo del miocardio
Factor estimulador de colonias de granulocitos	1) Neupogen	Roche / Amgen	Leucemia, Úlceras del pie diabético
Hormona de crecimiento	1) Genotropin	Pfizer	Deficiencia de hormona de crecimiento en niños
	2) Nutropin	Genetech	Deficiencia de hormona de crecimiento en niños
Interleucina	1) Proleukin	Chiron/Roche	Cáncer renal
Factor de Crecimiento Epidérmico	1) HeberProt-P	HerberBiotec	Úlceras del pie diabético
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	1) Regranex	Johnson & Johnson	Úlceras neuropáticas diabéticas de miembros inferiores

Sin embargo, las proteínas como agentes terapéuticos, presentan algunas limitaciones, por ejemplo su inestabilidad físico – química en algunos fluidos corporales (ej.: en la saliva y los jugos gástricos) lo cual limita el uso de ciertas rutas de administración como es el caso de la vía oral. Por otra parte, el

gran tamaño de estas biomoléculas limita el uso de la vía transdérmica. Como consecuencia de esto la vía parenteral es la más utilizada para introducir las proteínas en el organismo. A los inconvenientes propios de esta vía, se adicionan otros inherentes al comportamiento de las proteínas como principio activo: *i)* corto tiempo de vida media en el organismo, lo cual conlleva a una alta frecuencia de administración; *ii)* generación de efectos adversos propios de su mecanismo de acción o de efectos colaterales indeseados y *iii)* presencia de inmunogenicidad en algunos casos (2-6).

Debido a las limitaciones mencionadas anteriormente se trabaja en la búsqueda de nuevos sistemas de administración que permitan aprovechar el potencial terapéutico de las proteínas con el mínimo de inconvenientes posible. Los tres sistemas que se han aplicado con mayor éxito a los péptidos y proteínas son: los basados en la modificación química de las biomoléculas (PEGilación) y los que se basan en la encapsulación de las moléculas en sistemas lipídicos (liposomas) o poliméricos (microesferas) (2, 7, 8).

PEGilación

La conjugación de las proteínas con polietilenglicol (PEG) es llamada PEGilación. La idea de la PEGilación surgió a finales de los '60 con los trabajos de Davis y cols. (12) y su objetivo inicial fue la disminución de la inmunogenicidad de las proteínas. No obstante, después se demostraron otras características deseables que le proporcionaba la conjugación con PEG a las proteínas tales como mayor tiempo de vida en el organismo, mayor estabilidad térmica y frente a la acción de proteasas (13, 14). De ellas, en la actualidad, el aumento del tiempo de vida *in vivo* es la característica más explotada de las que le proporciona el PEG al conjugado.

Liposomas

Los liposomas son vehículos coloidales formados por una bicapa de fosfolípidos capaz de cargar en su interior sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas. Las estructuras únicas de los liposomas les brindan un número de propiedades deseadas. Ellos alteran la distribución en los tejidos de los fármacos encapsulados aumentando así la eficacia y disminuyendo la toxicidad. Los liposomas también pueden ser usados para dirigir pasivamente los fármacos a los tejidos enfermos. En enfermedades asociadas al incremento de la permeabilidad capilar (cáncer, infección, inflamación) los liposomas se concentran en una mayor extensión en las zonas afectadas con respecto a los tejidos sanos, donde los capilares sanos no dejan entrar a estas estructuras (15).

Microesferas

Las microesferas biodegradables de polímeros biocompatibles han sido estudiadas en los últimos 20 años como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. Para la encapsulación de estas moléculas se han empleado polímeros naturales y sintéticos; entre estos últimos se destacan los homopolímeros y copolímeros del ácido láctico y el ácido glicólico (2, 10, 16). En las microesferas de estos polímeros el fármaco está usualmente distribuido en la matriz polimérica y es liberado mediante dos mecanismos fundamentales: la difusión a través de la matriz y la degradación del polímero que conlleva a la erosión de las partículas.

A pesar de las bondades que estos sistemas ofrecen, cada uno tiene desventajas, por lo que la selección de alguno de ellos dependerá de la proteína a incluir, así como de la aplicación y propiedades del producto que se desea obtener.

En la Tabla 2.2 aparecen, de forma comparativa, las ventajas y desventajas que ofrecen estos tres sistemas de liberación modificada para péptidos y proteínas (6).

Tabla 2.2. Ventajas y desventajas de los sistemas de liberación más utilizados para péptidos y proteínas.

Sistema	Ventajas	Desventajas
PEGilación	<ul style="list-style-type: none"> Mejora la farmacocinética del producto Reduce la fluctuación en la concentración del principio activo Disminuye la toxicidad del fármaco y la inmunogenicidad Incrementa el nivel de vida del paciente Incrementa la estabilidad físico-química de la proteína 	<ul style="list-style-type: none"> Disminuye la actividad biológica de la proteína Una fracción importante de las proteínas se pierde en el proceso El producto final casi siempre es heterogéneo (isómeros de posición)
Liposomas	<ul style="list-style-type: none"> Mejoran la farmacocinética del producto Disminuyen la toxicidad del fármaco Permiten dirigir pasivamente el fármaco a los tejidos 	<ul style="list-style-type: none"> Son capturados por el sistema retículo endotelial Producen debilitamiento vascular Es difícil lograr una estabilidad físico-química de larga duración
Microesferas	<ul style="list-style-type: none"> Mantienen niveles séricos del fármaco por largos períodos de tiempo Garantizan poca fluctuación en la concentración sérica del fármaco Mejoran la aceptación del tratamiento por parte del paciente 	<ul style="list-style-type: none"> Liberación incompleta de la proteína Inestabilidad de las proteínas frente a la microencapsulación

De estos tres sistemas, para proteínas terapéuticas, el que más ha avanzado industrialmente es la PEGilación que ya cuenta con varios productos en el mercado (2); sin embargo, las limitaciones que se relacionan en la Tabla 2, fundamentalmente la disminución de la actividad biológica de la proteína conjugada y la heterogeneidad del producto final obtenido, hacen que muchas compañías y grupos de

investigación se encuentren envasados en la microencapsulación de péptidos y proteínas para el desarrollo de formulaciones ventajosas de estos fármacos con respecto a las formulaciones de liberación inmediata que ya existen.

2.1.1 Interferón alfa-2b

Los interferones son citocinas con propiedades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras, que son producidas por el organismo como respuesta a infecciones virales y tumores así como para regular el sistema inmune. Existen tres tipos de interferón: alfa (α), beta (β) y gamma (γ) y se clasifican de acuerdo con su origen celular y el tipo de receptor al cual se unen para realizar su función. El interferón alfa es producido por los leucocitos, el beta por los fibroblastos y el gamma por las células T y NK activadas. Los dos primeros (α y β) se agrupan como de tipo I ya que se unen a receptores celulares de tipo 1 y aunque tienen diferentes afinidades por él, presentan similares efectos biológicos, principalmente de tipo antiviral y antiproliferativo. El interferón γ es considerado de tipo II ya que se une al receptor celular de tipo 2 y tiene fundamentalmente propiedades inmunomoduladoras, aunque también exhibe más débilmente propiedades antivirales (17).

Este interesante conjunto de biomoléculas fue descubierto por Isaacs y Lindenmann en 1957 (18) y sus propiedades los han señalado como potenciales biofármacos. Durante todo este tiempo se han realizado estudios para probar su eficacia en el tratamiento de diversas enfermedades de naturaleza viral y varios tipos de cáncer (17).

Por muchos años la fuente de interferón humano para la investigación fue limitada por lo costosas que resultaban las técnicas de obtención de las proteínas, fundamentalmente de fuentes naturales (19, 20). Sin embargo, en los años 80, con el desarrollo de la Ingeniería Genética y la Biotecnología a nivel internacional, el interferón, como otras proteínas, llegó a estar disponible en mayores cantidades, al producirse en organismos genéticamente modificados (21).

A escala mundial los interferones son ampliamente utilizados como medicamentos. Entre ellos los interferones alfa son los que más se producen, siendo el IFN- α 2b el que se obtiene en Cuba desde 1987 por medio de la Ingeniería Genética. La eficacia del interferón cubano en el tratamiento de diversas patologías virales y oncológicas ha sido ampliamente demostrada (11, 22, 23).

En el mercado existen diferentes tipos de formulaciones con IFN- α 2b como principio activo. Se destacan los inyectables liofilizados y líquidos de la molécula nativa o PEGilada (24). El IFN- α 2b cubano se encuentra disponible en estas formulaciones (14, 25-27) y, además existe una crema y un gel para aplicaciones tópicas y un colirio para el tratamiento de afecciones oculares (11).

El IFN- α 2b que se administra por la vía parenteral experimenta, como otras proteínas, la eliminación del organismo en pocas horas (25). Por esta razón debe ser administrado 3 veces por semana en la mayoría de los tratamientos, los cuales se extienden por varios meses. Este inconveniente ha sido reducido con el desarrollo de una formulación con el IFN- α 2b conjugado a un PEG de $40 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ (14, 25, 28) la cual se administra sólo una vez por semana. No obstante, una formulación con el IFN- α 2b encapsulado en microesferas pudiera disminuir aún más la frecuencia de administración y reducir los efectos adversos que se producen por la liberación rápida al organismo de una gran cantidad de la proteína, debido a que estas partículas funcionan como reservorios de los que es posible liberar cantidades efectivas menores.

2.1.2 Factor de Crecimiento Epidérmico

El FCE es un polipéptido de 53 aminoácidos (aa) que estimula la proliferación y diferenciación de las células epiteliales (29), por lo que se ha estudiado como posible agente terapéutico en el tratamiento de heridas de diferente naturaleza (30, 31), la reparación del daño en la mucosa gastrointestinal (32, 33) y de otros sistemas (34, 35).

En Cuba se produce esta proteína por la vía del ADN recombinante desde 1987 y se ha demostrado su eficacia en el tratamiento de quemaduras y otros tipos de heridas (31, 36, 37). De hecho, se ha empleado desde hace varios años como principio activo de una crema cicatrizante (31, 38). Más recientemente se ha comprobado que la deficiencia de FCE que existe en las úlceras crónicas de los miembros inferiores de pacientes diabéticos (úlceras del pie diabético), puede ser contrarrestada con la administración local de FCE exógeno y lograrse la cicatrización de estas lesiones (30, 36). En nuestro país ya existe una formulación parenteral que contiene FCE como agente activo (HeberProt-P) y se ha demostrado su efectividad en la prevención de la amputación de miembros inferiores de pacientes diabéticos (39).

El tratamiento que se aplica a los pacientes diabéticos con el producto HeberProt-P tiene el inconveniente de ser traumático ya que la administración de inyecciones en la lesión es muy dolorosa. En cada tratamiento deben aplicarse varias inyecciones y el paciente debe recibir el tratamiento en días alternos durante un período de 5 a 8 semanas. Teniendo en cuenta los inconvenientes de este método, el empleo de una formulación con el FCE encapsulado en microesferas biodegradables, pudiera ofrecer ventajas con respecto a la formulación de liberación inmediata existente, especialmente en la reducción de la frecuencia de administración del FCE con lo que se lograría mayor aceptación del medicamento por parte del paciente (9, 10)

2.2 La microencapsulación de proteínas terapéuticas

2.2.1 La microencapsulación

La microencapsulación es el recubrimiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos con una capa de material polimérico o graso originando partículas de flujo libre del tamaño de micrómetros. El producto resultante de este proceso tecnológico recibe el nombre de “micropartícula”, “microcápsula” o “microesfera”, sistemas que se diferencian en su morfología y estructura interna. Cuando las partículas poseen un tamaño inferior a 1 μm , el producto resultante del proceso de encapsulación recibe el nombre de “nanoesfera”, “nanopartícula” o “nanocápsula” (40).

La microencapsulación surge en el año 1931, con la publicación de un trabajo que describía la formación de microcápsulas de gelatina según un procedimiento que recibió la denominación de “coacervación” (40). En los años siguientes la microencapsulación diversificó sus aplicaciones a diferentes ramas tales como la agricultura (microencapsulación de fertilizantes y pesticidas), las construcciones navales (elaboración de cubiertas de tornillos y remaches con el objetivo de protegerlos contra la corrosión), la industria cosmética (la elaboración de desodorantes, champús, nebulizadores, buscando mejorar la estabilidad o biodisponibilidad de los productos) y la industria médico-farmacéutica. En esta última se han ampliado las aplicaciones de la microencapsulación entre las cuales se encuentran: enmascarar propiedades organolépticas indeseables que pueden presentar algunas sustancias (olor, color, sabor desagradable), aislar algún componente de una formulación sensible a las condiciones ambientales o también algún componente tóxico para los operarios o el ambiente, revestir partículas que por su forma irregular son difíciles de comprimir, convertir principios activos líquidos en sólidos ya que son más fáciles de manipular y, sobre todo, en el diseño de formulaciones de liberación controlada de fármacos con diferente fines.

Específicamente en el campo de la liberación modificada de biomoléculas la microencapsulación se emplea con el objetivo de alcanzar una o varias de las siguientes ventajas (9, 10):

- Disminución de la frecuencia de administración, lo que conlleva a una mayor aceptación por parte del paciente.
- Aumento del beneficio terapéutico debido a la eliminación de las fluctuaciones en los niveles séricos de la proteína.
- Disminución de la dosis total requerida para un tratamiento debido a una mayor eficiencia en el aprovechamiento de la dosis administrada.

- Disminución de los efectos adversos ya que disminuye la magnitud de la cantidad de proteína liberada en el organismo al momento de la aplicación.

La variedad de materiales que pueden emplearse para fabricar las micropartículas se ha ampliado gradualmente en la medida en que surgen nuevos biomateriales y se perfilan nuevas aplicaciones de la microencapsulación. De modo general, los materiales capaces de constituirse en micropartículas se clasifican en tres categorías: grasas, proteínas y polímeros (40). En el campo específico de la liberación controlada de fármacos, los materiales de cubierta más utilizados son los polímeros, naturales y sintéticos; y de ellos, los más ampliamente estudiados son los homopolímeros y copolímeros derivados de ácido láctico y ácido glicólico que comúnmente se denominan con las siglas en inglés PLGA o PLGAs.

Los PLGAs son poliésteres que se obtienen mediante la policondensación lineal de los hidroxiácidos o mediante la apertura del anillo de las lactonas correspondientes (41) (Figura 2.1).

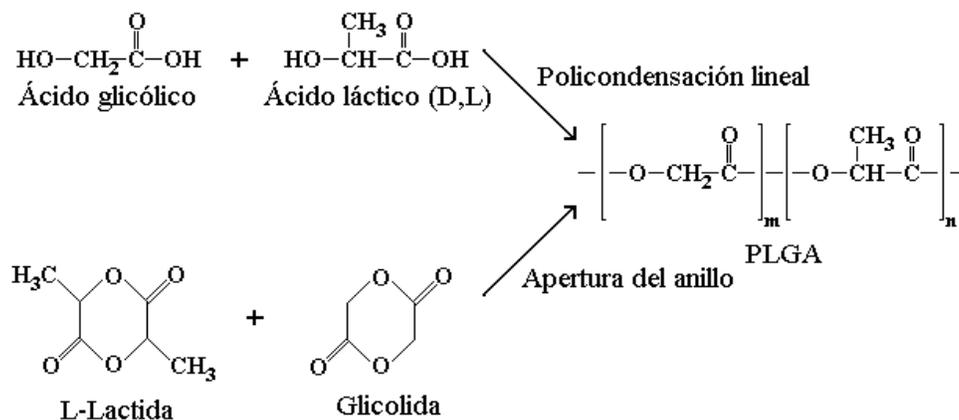


Figura 2.1. Vías de obtención de los copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico.

Estos polímeros son solubles en solventes orgánicos como diclorometano (DCM), cloroformo, acetato de etilo, acetona y tetrahidrofurano (THF); pero no son solubles en agua. Algunos son semicristalinos y otros amorfos en dependencia de la proporción de ácido láctico y glicólico, siendo precisamente los amorfos los más empleados en el diseño de formulaciones de liberación controlada. Ellos difieren, además de la proporción de los monómeros que lo componen, en su masa molecular (entre 5 y $100 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ aproximadamente) y en el grupo terminal ($-\text{COOH}$ o $-\text{COOR}$). Estos tres parámetros determinan, en gran medida, su hidrofobicidad y cinética de degradación y, a su vez, la eficiencia de encapsulación y la velocidad de liberación de la sustancia encapsulada (42, 43).

El término biodegradable para estos polímeros se refiere a la hidrólisis de sus enlaces éster por contacto con los fluidos biológicos o artificiales. Esta reacción produce ácido láctico y glicólico, los cuales son metabolizados en el ciclo de Krebs hasta formar agua y CO₂ (42). Al ser empleados como matrices en la obtención de microesferas, su degradación ocurre en dos etapas. La primera comprende la escisión hidrolítica de los enlaces éster, propiamente llamada degradación, y en la cual se generan oligómeros y monómeros con la consiguiente disminución de la masa molecular del polímero original. En la segunda etapa, llamada erosión, ocurre la pérdida de masa de la matriz y la velocidad de escisión de los enlaces puede aumentar debido a la acción autocatalítica de los productos de degradación de naturaleza ácida (44).

Precisamente, el hecho de que estos polímeros no sean solubles en agua pero puedan ser degradados por ella, los hace de extraordinaria utilidad en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos.

Por otra parte, los PLGAs son biocompatibles ya que no presentan toxicidad al ser introducidos en el organismo por diferentes vías (45). De hecho, desde hace muchos años, estos polímeros se utilizan en la producción de hilo de sutura biodegradable, así como en la fabricación de dispositivos ortopédicos de fijación tales como discos, tornillos y pernos (46).

Para disolver los PLGAs se han utilizado fundamentalmente el acetato de etilo, el cloroformo y el diclorometano. Este último ha sido el más utilizado por su elevada volatilidad, bajo punto de ebullición y su inmiscibilidad con el agua. Además, se ha comprobado que las microesferas obtenidas con DCM como disolvente tienen mayor eficiencia de encapsulación y mejores características morfológicas (10).

Existen numerosos métodos para obtener micropartículas agrupados en tres grupos: físico-químicos, químicos y mecánicos (40). Los métodos físico-químicos, por ejemplo los de coacervación simple y compleja, han sido muy estudiados a escala de laboratorio pero no han alcanzado una gran aplicación a nivel industrial. Los métodos físico-mecánicos han sido ampliamente usados en el laboratorio y en la industria por la factibilidad de su aplicación y entre ellos se destacan el de extracción - evaporación del disolvente y el de secado por aspersión. Los métodos químicos como la polimerización interfacial y heterogénea suelen llevarse a cabo bajo condiciones bien toleradas por moléculas frágiles pero no ha podido evitarse la presencia de residuos del monómero en el producto final.

2.2.2 Técnicas más empleadas para microencapsular péptidos y proteínas

De la gran variedad de técnicas de microencapsulación que se han ido desarrollando, sólo algunas han sido más aplicadas a la obtención de microesferas cargadas con sustancias de naturaleza proteica;

precisamente, por la fragilidad de estas moléculas frente a las condiciones experimentales de los procesos de microencapsulación. Entre ellas se encuentran la de coacervación simple mediante la adición de un no solvente, el secado por aspersion, la polimerización interfacial y la de evaporación del disolvente a partir de una doble emulsión (2, 43). A continuación de mencionan las principales ventajas y desventajas de estas técnicas.

El método de coacervación simple mediante la adición de un no solvente permite obtener eficiencias de encapsulación elevadas, pero la presencia de residuos de solvente en el producto final y la dificultad en el escalado del proceso, han restringido su empleo en la obtención de productos biofarmacéuticos (47). También es difícil obtener partículas pequeñas, de varios micrómetros de tamaño (16).

El secado por aspersion también permite alcanzar elevadas eficiencias de encapsulación y es un procedimiento que puede ser escalado con relativa facilidad; además facilita realizar el proceso en condiciones asépticas (43). Varios autores han evaluado diferentes características de la microcápsulas obtenidas por esta técnica, sin embargo, son pocos los que se refieren a la estabilidad de las proteínas encapsuladas. Estas pueden resultar afectadas durante el proceso de microencapsulación al ser expuestas a condiciones drásticas tales como la presencia de solventes orgánicos y elevada temperatura. Por esta razón resulta indispensable verificar la actividad biológica de cualquier proteína encapsulada por este método (48). Otra limitación de esta técnica radica en las pérdidas de producto final en la cámara de expansión del equipo que se emplea para obtener las micropartículas y en la dificultad para controlar el tamaño de partícula (49).

La polimerización interfacial tiene como ventaja fundamental que puede llevarse a cabo bajo condiciones suaves que permiten conservar toda o gran parte de la actividad biológica de la proteína encapsulada. Sin embargo, la presencia de residuos del monómero en el producto final, es un inconveniente que ha limitado su uso para la obtención de un producto biofarmacéutico (50).

El método evaporación del disolvente a partir de una emulsión simple se ha utilizado fundamentalmente para encapsular algunos péptidos (51). En los últimos años, se ha impuesto el empleo de una emulsión doble agua-en-aceite-en-agua (w/o/w, siglas en inglés) (10, 52-55), para fármacos muy hidrofílicos, entre los que se encuentran las proteínas. Este último es el más empleado a escala de laboratorio con fines investigativos y, conjuntamente con el de conservación simple (también denominado separación de fases), es el que más se ha utilizado, a escala industrial, para obtener la mayoría de los productos que se comercializan (56). Esto se debe a su sencillez en cuanto al procedimiento experimental y al equipamiento requerido. Su principal desventaja está relacionada con las condiciones propias del proceso, pues algunas resultan drásticas para las proteínas (42, 57). Por

ejemplo, la exposición a solventes orgánicos y la agitación vigorosa para formar las emulsiones pueden conllevar a una pérdida de la actividad biológica del fármaco (58-60). Sin embargo se ha logrado encapsular varias proteínas con un buen grado de conservación de su actividad biológica (61, 62).

Recientemente se ha diseñado una variante de este último que ha permitido encapsular la hormona de crecimiento humana con su actividad biológica casi intacta y que consiste en llevar a cabo el método de doble emulsión - evaporación del disolvente a la temperatura del nitrógeno líquido; por lo que recibe el nombre de método criogénico (63, 64).

A pesar de las ventajas de este último método en cuanto a la conservación de las propiedades de la proteína encapsulada, su implementación no se ha generalizado debido a la complejidad del equipamiento que se necesita. Quizás, por su sencillez, el de evaporación del disolvente sigue siendo el más estudiado y el que ha sido probado para un mayor número de proteínas.

2.2.3 Caracterización de microesferas cargadas con proteínas

Existen diferentes características de las microesferas que deben ser evaluadas cuidadosamente para determinar el impacto de diversos factores experimentales en ellas y para comprobar si las mismas son adecuadas para emplearse como sistema de liberación modificada de un fármaco. Finalmente, si la preparación estudiada se convierte en un producto farmacéutico, muchas de estas características serán determinadas de forma sistemática como parte del control de calidad del producto. En este epígrafe se relacionan los parámetros que más comúnmente se emplean para la caracterización de las microesferas poliméricas que son empleadas como sistemas de liberación de fármacos. Se describe también la repercusión que tiene cada una de estas características en las propiedades de las microesferas así como las técnicas más empleadas para su estudio.

Morfología

Los estudios morfológicos de micropartículas revelan características importantes de las mismas tales como: forma; regularidad de la superficie; continuidad de la membrana en el caso de las microcápsulas; presencia de poros y uniformidad de su distribución en las partículas, así como el tamaño de los mismos; homogeneidad del tamaño de las partículas; presencia de defectos en estas y/o agregación. También permite tener una idea del tamaño de las partículas aunque no es la técnica preferida para determinar este parámetro.

Estas características tienen repercusión en las propiedades y aplicaciones de las micropartículas obtenidas. Por ejemplo, la presencia de agregación afecta la homogeneidad del producto elaborado; además en el caso que se desee inyectar las partículas, se pueden tupidar las agujas. Por otra parte, la

cantidad y tamaño de los poros pueden incidir en la liberación de la sustancia encapsulada y hasta modificar el mecanismo por el cual ocurre.

La morfología de las partículas se estudia mediante técnicas de microscopía de las cuales la más empleada es la microscopía electrónica de barrido (SEM, siglas en inglés) (65-67). Aunque con menor frecuencia, también se han utilizado otros tipos de microscopía. Por ejemplo, la microscopía de fuerza atómica se ha empleado fundamentalmente para el estudio de superficies de nanoesferas (68); la microscopía confocal se ha utilizado para obtener evidencias de la acidez generada en el interior de las microesferas como consecuencia de la degradación del PLGA (69) o para estudiar la distribución de la proteína en el interior de la partícula (70, 71) y la microscopía de fluorescencia ha sido empleada para determinar la estructura interna de las partículas (72).

Las propiedades morfológicas de las micropartículas pueden ser afectadas por la técnica de microencapsulación empleada y, particularmente, por las condiciones experimentales en que éstas se lleven a cabo. Por ejemplo, el tipo de solvente y la velocidad de evaporación del mismo pueden ocasionar diferencias importantes en la morfología de las partículas (73, 74). También la adición de sales en una o las dos fases acuosas de la doble emulsión, puede generar partículas con diferente estructura interna (75).

Tamaño de partícula

El tamaño de las microesferas es un parámetro importante. Para microesferas que van a ser administradas por la vía parenteral se recomienda que no exceda 180 μm (76, 77). Además debe lograrse que este parámetro sea reproducible entre los diferentes lotes ya que puede influir en el perfil de liberación y en otras características tales como la eficiencia de encapsulación. Varias condiciones experimentales afectan el tamaño final de las microesferas elaboradas mediante cualquiera de los métodos relacionados anteriormente. El tipo de polímero y su masa molecular (78, 79), la proporción entre el polímero y el fármaco (79, 80), la concentración del polímero en la fase orgánica (81, 82), la concentración del agente tensoactivo en la fase acuosa externa (80, 81, 83) y la velocidad de agitación al formar las partículas (84-86) son los factores que más inciden en el tamaño de las microesferas.

Por todo lo anterior, el tamaño de la microesferas y su distribución debe ser determinado cuidadosamente. Se han desarrollado muchas técnicas para determinar esta característica a sistemas particulados de diversa naturaleza: centrifugación, sedimentación, ultracentrifugación analítica, conductividad eléctrica, microscopía óptica y electrónica, dispersión de la luz y difracción láser entre otros (87). Sin embargo, las diferencias entre los principios de medición de cada uno y los

requerimientos de cada equipo para construir los modelos a partir de los datos experimentales, generan inconsistencia en los resultados que arrojan diferentes equipos al analizar una muestra. Por otra parte, no todas las técnicas cubren el rango de tamaños que pueden tener estos sistemas; sólo la microscopía electrónica cuenta con esta ventaja. Burgess y cols. ofrecen un análisis exhaustivo de este tema y recomiendan seleccionar el método más apropiado para cada caso particular, teniendo en cuenta el proceso productivo, el tamaño de partícula requerido para los lotes destinados a la clínica y la existencia de fenómenos de segregación de las partículas de acuerdo con el tamaño durante la procesos fabricación y el almacenamiento de las formulaciones (87).

Carga y eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) es la fracción, expresada en porcentaje, de proteína encapsulada con respecto a la cantidad total que se emplea para realizar el proceso (82). Es un parámetro muy importante para medir la calidad del proceso, que es más eficiente en la medida que se logre encapsular una fracción mayor del fármaco.

Por otra parte, la carga (Q) es la cantidad de proteína encapsulada por masa de microesferas y también se expresa en porcentaje (82). Este parámetro puede tener un rango de valores amplio de acuerdo fundamentalmente con la dosis que se requiere administrar de la proteína y debe ser determinado de forma exacta, justamente porque define la cantidad de microesferas que deben incluirse en una unidad de la formulación. Consecuentemente, es importante demostrar que, al ejecutar un procedimiento de encapsulación dado, la carga sea reproducible y, a la vez, que el método elegido para determinarla también lo sea.

Para determinar estos parámetros se han utilizado varias formas de llevar la proteína encapsulada a una fase acuosa en la cual pueda ser cuantificada adecuadamente. Entre ellas se pueden mencionar la extracción en dos fases líquidas inmiscibles, la precipitación con solventes orgánicos seguida de filtración y la hidrólisis acelerada del polímero mediante la incubación de las microesferas en presencia de NaOH (88). De estos tres procedimientos el más generalizado es el último ya que genera soluciones acuosas que luego de neutralizadas pueden analizarse por varios ensayos de cuantificación de proteínas totales: absorbancia a 280 nm o específicamente a la longitud de onda de máxima absorción para la proteína en cuestión, Lowry, Bradford y microBCA, siendo este último el más empleado.

La carga y la eficiencia de encapsulación son afectadas de manera importante por el método de encapsulación y las condiciones experimentales en que se obtienen las micropartículas. Entre los factores que más los afectan se pueden citar el volumen y la concentración de la proteína en la fase

acuosa interna, la concentración de polímero en la fase orgánica, el tipo de polímero, los tiempos de agitación al formar las emulsiones, así como la presencia de aditivos en las diferentes fases de las emulsiones (82, 89, 90).

Humedad residual

La presencia de agua en las partículas puede provocar que ocurran fenómenos indeseables tales como cambios en la matriz polimérica por la hidrólisis de los enlaces éster del polímero, o cambios en la proteína favorecidos por el medio húmedo (57). Por esta razón resulta importante determinar la humedad residual en las microesferas. El método de Karl-Fisher, que se emplea comúnmente para determinar la humedad de liofilizados, se ha utilizado también para determinar la cantidad de agua residual presente en las microesferas (63).

La humedad residual en las formulaciones basadas en microesferas depende, en gran medida, de la técnica de obtención de las partículas y del método empleado para secarlas. La liofilización ha sido el método más generalizado para secar, a escala de laboratorio, las microesferas cargadas con proteínas, debido a sus bondades en la conservación de las propiedades de las mismas. Para fabricar lotes industriales de microesferas se ha utilizado el secado al vacío en equipos específicos. En ambos casos ha sido posible obtener microesferas con baja humedad residual (63).

Solvente residual

Los solventes residuales en formas farmacéuticas se definen como productos químicos orgánicos volátiles que se utilizan o se producen en la fabricación de medicamentos y excipientes. Debido a la toxicidad de estas sustancias, debe evitarse su presencia en cualquier medicamento. Sin embargo, en la mayoría de los casos resulta imposible eliminarlos totalmente durante los procesos tecnológicos de producción, por lo tanto deben ser cuantificados como parte del control de calidad de las formulaciones y su contenido debe ser inferior al límite establecido por las agencias reguladoras (91).

La cromatografía gaseosa ha sido la técnica más utilizada para determinar estas sustancias en las microesferas (63, 73, 91), aunque recientemente se estudian técnicas alternativas para este fin (92).

El método de encapsulación puede influir de forma notable en el contenido de solvente residual en las microesferas, así como el tipo de solvente empleado específicamente (73). Otro factor importante que afecta directamente este parámetro es el método de secado y las condiciones en que éste se realiza.

Perfil de liberación

Este parámetro resulta de gran importancia al diseñar microesferas de proteínas con fines terapéuticos. Es un parámetro que se estudia *in vitro* y que puede correlacionar o no con las características de la liberación *in vivo*. No obstante, generalmente el estudio *in vitro* ofrece una idea de la potencialidad del sistema obtenido para satisfacer el propósito con el cual se desarrolla.

La liberación de proteínas contenidas en microesferas de PLGAs exhibe comúnmente un patrón compuesto por tres etapas: 1) una de liberación inicial rápida que ocurre generalmente durante el primer día y que está determinada fundamentalmente por la proteína que se encuentra en la superficie de las microesferas y de los poros y canales que componen la estructura interna de la micropartícula, los que se llenan con el medio de incubación durante las primeras horas del ensayo; 2) otra de liberación lenta en la que se libera muy poca o ninguna proteína y 3) la última de liberación más rápida determinada por la erosión de las partículas (7, 93, 94). En ocasiones la liberación puede ocurrir en dos etapas y el perfil muestra una forma asintótica (88) (Figura 2.2).

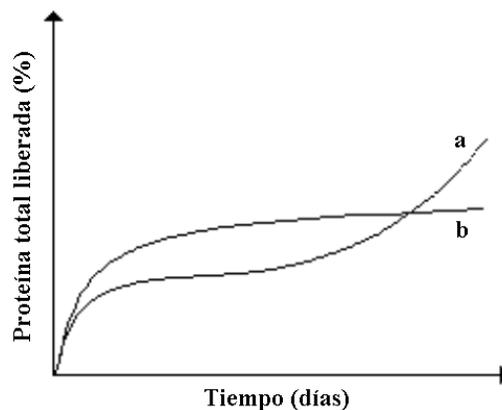


Figura 2.2. Patrones de liberación de las proteínas encapsuladas: a) en tres etapas, b) asintótico.

A la liberación de las proteínas encapsuladas en microesferas de PLGAs contribuyen generalmente los procesos de difusión de la misma a través de los poros y canales que tienen las partículas y la erosión de estas que ocurre como consecuencia de la degradación de la matriz polimérica (7). Los poros y canales de las micropartículas se forman como producto del propio proceso de fabricación o por la modificación de la estructura como consecuencia de la degradación del polímero (43). Entre los factores que influyen en el perfil de liberación de las proteínas encapsuladas en microesferas de PLGAs se destacan las características de la matriz polimérica empleada y de la proteína encapsulada, la

estructura de la micropartícula obtenida, la técnica de encapsulación y las condiciones experimentales en que se lleva a cabo la misma, así como la co-encapsulación de aditivos con diversos fines (9).

Además de las características de las microesferas que determinan el perfil de liberación, existen otros factores relacionados con las condiciones en que se realizan estos estudios que también pueden afectar la liberación, por ejemplo la composición y el volumen del medio de incubación, la temperatura, el dispositivo que se emplee para estudiar el perfil, la forma y velocidad de agitación, y el modo de recambiar el medio de incubación (parcial o completo) (7, 66, 95, 96).

Al realizar los estudios de liberación en las microesferas cargadas con proteínas, a menudo se obtiene una gran variabilidad en los resultados debido a la degradación de las biomoléculas como consecuencia del efecto del medio ácido generado por los productos de degradación de la matriz polimérica y de la exposición de las mismas al medio acuoso. Este inconveniente puede ser resuelto cambiando el medio de incubación frecuentemente o midiendo la cantidad de proteína que queda en las microesferas en vez de la concentración existente en la solución de incubación (87).

Otro aspecto importante a considerar es la variación que en los perfiles de liberación pueden ocasionar los cambios indeseados en las propiedades de la proteína. Por ejemplo, la formación de agregados durante el proceso de encapsulación y/o durante el estudio de liberación, así como la presencia de interacciones hidrofóbicas entre la proteína y las matrices poliméricas. Lo anterior está estrechamente relacionado con las propiedades de la proteína encapsulada, la matriz polimérica empleada y las condiciones de la encapsulación (97, 98).

Esterilidad

Las formulaciones elaboradas con estos sistemas no pueden ser esterilizadas por vapor o irradiación ya que las propiedades de la matriz polimérica y de la biomolécula encapsulada pueden sufrir modificaciones indeseadas. Por otra parte, el tamaño de las partículas impide el empleo de la filtración para esterilizar el producto final. Estas limitaciones han obligado a producir estas formas farmacéuticas en condiciones asépticas, por lo que resulta de vital importancia verificar la esterilidad interna y externa de las mismas (56, 87).

2.2.4 Caracterización de las proteínas encapsuladas

La caracterización que se debe hacer de la proteína encapsulada está estrechamente relacionada con la naturaleza de cada molécula particular y debe poder reflejar la aptitud de la misma para realizar su función. De forma general se emplean técnicas cromatográficas, electroforesis, ensayos inmunoenzimáticos y de actividad biológica (1).

Debido a que los PLGAs no son solubles en agua se requiere diseñar un procedimiento de extracción de la proteína encapsulada. Este procedimiento no debe introducir cambios en las propiedades de la proteína encapsulada y debe generar muestras acuosas apropiadas para caracterizar a la molécula en cuestión (1). Se han referido varios métodos basados en la extracción de la proteína mediante un sistema de dos fases líquidas inmiscibles (99), la extracción por precipitación de la proteína con solventes orgánicos en los cuales el polímero es soluble (88, 100) y la extracción mediante electroforesis (65, 101, 102). Específicamente, la extracción en sistemas de dos fases líquidas no miscibles ha sido utilizada por algunos investigadores con buenos resultados para la evaluación de las propiedades de péptidos encapsulados (51, 103, 104), mientras que otros autores han encontrado que el recobrado de la biomolécula puede verse afectado debido a que las proteínas tienden a distribuirse entre la interfase y la fase acuosa (88). Además este hecho también puede producir cambios en la proteína extraída alterando los resultados reales. No obstante, este tipo de extracción pudiera ser empleado si se demuestra que es aplicable al sistema en estudio. Con los métodos de precipitación ocurre algo similar, existen proteínas que pueden experimentar interacciones con los materiales poliméricos en las condiciones en las que se realiza la extracción lo cual conlleva a obtener recobrados no cuantitativos. De manera general, todos estos procedimientos tienen ventajas y desventajas, y pueden ser apropiados o no para la proteína de interés, de modo que para cada sistema debe seleccionarse el método adecuado. Existe otro conjunto de técnicas que potencialmente pudieran emplearse para el estudio de las características de la proteína sin necesidad de extraerla previamente de las microesferas. Actualmente sólo la espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, siglas en inglés) ha comenzado a imponerse con buenos resultados (70, 105-107). Sin embargo, existen investigaciones recientes acerca de la utilidad potencial de otras técnicas con este fin. Por ejemplo, el dicroísmo circular y la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X han sido utilizadas para estudiar las características de proteínas adsorbidas a superficies (8).

2.2.5 Estabilidad de las proteínas frente al proceso de encapsulación. Estrategias de estabilización

Las proteínas son moléculas frágiles por lo que experimentan cambios en su estructura con relativa facilidad durante los procesos de producción, formulación y/o almacenamiento. Las modificaciones más frecuentes que sufren estas moléculas son: la desnaturalización, la agregación covalente y no covalente, la desamidación, la oxidación y el ensamblaje incorrecto de los puentes de disulfuro (43, 108-110).

Durante la microencapsulación se llevan a cabo operaciones que favorecen determinados cambios en la estructura de las proteínas los cuales repercuten luego en sus propiedades físico-químicas y biológicas.

Específicamente en el procedimiento de encapsulación por doble emulsión - evaporación del disolvente, las proteínas se exponen a interfases extensas, a la presencia de solventes orgánicos y, además, a fuerzas de cizalla originadas por la agitación requerida para formar las emulsiones (1, 8, 57). Esto genera principalmente modificaciones asociadas a cambios en la conformación de las proteínas, por ejemplo desnaturalización y agregación. Estas modificaciones, conjuntamente con la adsorción a la superficie de la matriz polimérica, invalidan la utilidad del sistema diseñado para su empleo en el desarrollo de productos farmacéuticos. Esto se debe a que las especies formadas a menudo son indeseables y porque impiden lograr las propiedades buscadas al diseñar el sistema, principalmente la liberación controlada y completa de la molécula que se encapsula.

Por la importancia que tiene la adsorción de las proteínas a interfases y, de forma particular, a superficies sólidas, en las características de un sistema de liberación basado en microesferas, se tratarán a continuación algunos aspectos relacionados con este tema.

La adsorción de proteínas a superficies

Las proteínas son grandes moléculas anfipáticas lo que las convierte en especies químicas con actividad superficial en la que se involucran varios tipos de interacciones. Por una parte se encuentran las interacciones intermoleculares tales como las fuerzas de Coulomb, las fuerzas de van der Waals, las fuerzas ácido-base de Lewis y las interacciones hidrofóbicas; y por otra, las interacciones intramoleculares que también contribuyen a la conformación espacial que adopta la proteína en un medio determinado (111).

Las interfases que favorecen las interacciones hidrofóbicas de las proteínas con ellas (por ejemplo: los materiales hidrofóbicos) generalmente causan cambios estructurales permanentes en las proteína y aceleran su agregación en solución (112).

Cuando las proteínas se adsorben a una interfase los cambios que experimenta su conformación favorecen la interacción entre ellas (112) por lo que la adsorción se convierte en causa y efecto a la vez.

La adsorción de la molécula a una superficie ocurre sólo si su interacción con ella resulta favorable y ésta se produce a través de su unión a la superficie por múltiples puntos, tantos como le permita la pérdida de entropía conformacional que se produce (113). En la Figura 2.3 aparece un esquema que ilustra la forma en que se adsorbe una molécula polimérica a una superficie.



Figura 2.3. Representación esquemática de una molécula polimérica adsorbida a una superficie a través de múltiples sitios de unión.

Cuando la molécula se encuentra en el punto isoelectrónico su estructura se encuentra menos expandida por la disminución de la repulsión interna de los grupos con igual carga. Este hecho, conjuntamente con la electroneutralidad relativa que presenta, hace que una mayor cantidad de moléculas puedan “acomodarse” en igual área superficial (Figura 2.4).

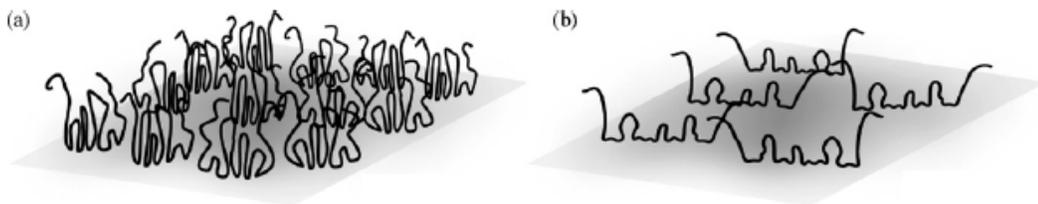


Figura 2.4. Representación esquemática de la adsorción superficial de un conjunto de moléculas anfifílicas: (a) en el punto isoelectrónico, (b) en condiciones alejadas de su punto isoelectrónico.

El proceso de adsorción de las proteínas a superficies puede comprenderse como el resultado de las contribuciones de la entropía y la energía libre originadas por: *i*) los cambios en la hidratación de la superficie adsorbente y la proteína, *ii*) la redistribución de los grupos cargados y movimiento de iones presentes en el entorno cuando se solapan la doble capa eléctrica entre la proteína y la superficie, y *iii*) los reordenamientos estructurales que ocurren en la proteína (Figura 2.5).

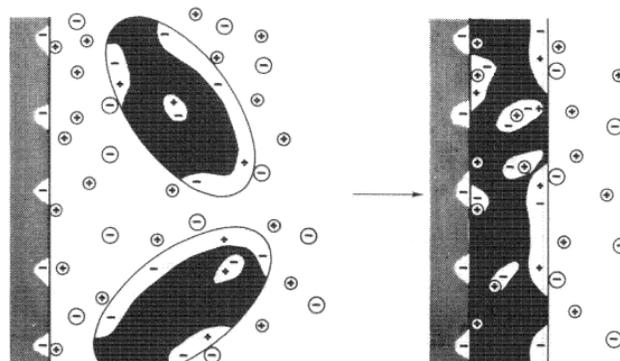


Figura 2.5. Representación esquemática de los fenómenos que ocurren en la proteína, la superficie y el entorno durante la adsorción de proteínas a superficies.

Con la adsorción las áreas de contacto entre la proteína y la superficie cambian su estado de hidratación. Si estas zonas de contacto son hidrofílicas su hidratación es favorable por lo que una parte del agua presente en ellas puede quedar retenida entre la proteína y la superficie adsorbente. Por el contrario, la deshidratación de áreas hidrofóbicas, disminuye la energía de Gibbs del sistema favoreciendo la adsorción. A menudo esta contribución es muy importante en la adsorción de proteínas a superficies hidrofóbicas lo que explica por qué ellas se adsorben a este tipo de superficies a pesar de que existan condiciones adversas desde el punto de vista de las interacciones electrostáticas que pudieran producirse (113, 114). La superficie de las proteínas solubles en agua son mayormente hidrofílicas pero pueden contener regiones hidrofóbicas cuyo número y extensión influye en la afinidad de la misma por las superficies de esta naturaleza.

Generalmente las superficies de la proteína y del adsorbente se encuentran eléctricamente cargadas. Estas cargas son neutralizadas por otras especies cargadas presentes en la solución que las rodea por lo que en la interfase entre la proteína y la superficie se forma una doble capa eléctrica. Cuando la proteína y la superficie se acercan se produce un solapamiento de estas capas eléctricas dobles que conlleva a una redistribución de los grupos cargados en la superficie, la proteína y la solución. Se han encontrado evidencias experimentales de que la afinidad de la proteína por la superficie es mayor cuanto menor es la cantidad de iones en solución que se requieren para neutralizar la carga de éstas en las regiones de contacto (114).

La transferencia de una molécula de proteína de la solución a la superficie ocasiona cambios en el entorno que pueden inducir, a su vez, modificaciones y/o reordenamientos en la estructura de la proteína. En un medio acuoso las partes hidrofóbicas de las proteínas se encuentran acomodadas en el interior de la molécula pero durante la adsorción estas partes pueden exponerse hacia la superficie sin contactar con el agua. Estos cambios producen un debilitamiento o pérdida de las interacciones hidrofóbicas intramoleculares. Las interacciones hidrofóbicas que ocurren entre las cadenas laterales de los aminoácidos son las que soportan la estructura secundaria en forma de hélice alfa o de hoja beta por lo que la afectación de las mismas genera una disminución de la presencia de estas estructuras generando un aumento en la libertad de giro de la cadena polipeptídica y por tanto un aumento de la entropía conformacional de la molécula que muchas veces es suficiente para compensar la entalpía positiva de la adsorción (114).

La magnitud de la adsorción de una proteína en una superficie y el efecto de la misma sobre la proteína están relacionados además con la fortaleza de su estructura. Aquellas moléculas cuya estructura

presenta una cohesión interna fuerte y, por tanto, mayor rigidez, son menos susceptibles a los reordenamientos estructurales provocados por el efecto de la cercanía de la superficie (113, 114).

Si la proteína que se encapsula se adsorbe en determinada proporción a la matriz polimérica, el fenómeno por sí solo puede influir directamente en la liberación incompleta de la misma (97). Pero, adicionalmente, puede contribuir a que ocurran cambios conformacionales en las moléculas que conlleven a la desnaturalización y a la formación de agregados (1, 97, 110). También pueden formarse agregados durante la preparación de las emulsiones debido al contacto de las proteínas con las interfases líquido-líquido. Los procesos de secado contribuyen también a eliminar el agua en las interfases proteína-superficie polimérica por lo que esta etapa puede favorecer la adsorción superficial con sus consecuencias negativas para la estabilidad de las proteínas encapsuladas.

Para reducir los efectos negativos que en la estabilidad de las proteínas pueden tener los diferentes procesos que ocurren durante la microencapsulación de éstas en matrices poliméricas, se han diseñado algunas estrategias de estabilización (8, 43, 57).

Algunas de las soluciones empleadas por los diferentes investigadores para evitar el cambio en las propiedades de las biomoléculas microencapsuladas aparecen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Estrategias y mecanismos de estabilización de las proteínas frente a las condiciones del proceso de microencapsulación por la técnica de doble emulsión - evaporación del disolvente.

Factor de estrés	Estrategia de estabilización (ejemplos)	Mecanismo de estabilización
Interfase agua / solvente orgánico	Adición de azúcares, polioles, PEG (106, 115, 116)	Aísla a la proteína de la interfase
	Aumento de la concentración de la proteína (115, 117, 118)	Disminuye la proporción interfase / proteína
	Adición de otras proteínas (82, 119)	Compite por la interfase
	Pre-encapsulación de la proteína en un núcleo hidrofílico (120)	Aísla a la proteína de la interfase
Contacto entre el PLGA y la proteína	Adición de tensoactivos (121-123)	Compite por el PLGA
	Pre-encapsulación de la proteína en un núcleo hidrofílico (120)	Blindaje contra el PLGA
	PEGilación de la proteína (124-128)	Disminuye la adsorción a la superficie
Cizalla	Reducción del tiempo de agitación	Minimiza el tiempo de exposición a la cizalla
	Evitar el ultrasonido para formar la primera emulsión (129)	Disminuye la exposición a la cizalla
Secado	Adición de agentes protectores en la liofilización	Aumenta la energía libre de Gibbs para el plegamiento incorrecto de la proteína
	Sustitución de la liofilización por otro método de secado	Elimina la etapa de congelación

Estas estrategias han sido estudiadas fundamentalmente desde el punto de vista académico, sin embargo, su aplicación práctica en microesferas de proteínas que van a ser incluidas en un producto farmacéutico debe ser cuidadosamente valorada. Esto se debe a las desventajas que algunas de ellas pueden tener desde el punto de vista de su introducción a nivel productivo y desde el punto de vista regulatorio en el caso de los aditivos que puedan quedar en la formulación final.

2.3 Microesferas de PLGAs cargadas con IFN- α 2b

Se han encontrado 13 reportes acerca de la microencapsulación de interferones alfa en diversos sistemas poliméricos (54, 60, 77, 127, 130-138) pero sólo 5 de ellos describen la obtención y caracterización de microesferas de PLGAs cargadas con IFN- α 2b (54, 77, 133, 135, 138).

En 1998, Khan y cols. describieron un método para obtener microesferas de PLGA cargadas con IFN- α 2b previamente estabilizado con el catión Zn^{2+} (77). Estos autores usaron interferón alfa 2b producido por Schering Plough (Kenilworth, NJ, EE.UU.), el cual fue encapsulado mediante el método criogénico (63, 64). La estabilidad del interferón durante la encapsulación fue mejorada por la adición de Zn^{2+} .

En el año 2008, Zhou y cols. publicaron la preparación y caracterización de microesferas magnéticas de PLA y PLGA 75:25 de $12 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ cargadas con IFN- α 2b de Shenzhen KeXing Biotechnology Company (GuangDong, China) mediante la técnica de doble emulsión - evaporación del disolvente (54). Ellos incluyeron nanopartículas de magnetita en las microesferas conjuntamente con el IFN- α 2b y comprobaron mediante microscopía electrónica de transmisión que las mismas quedaron distribuidas en el interior de las partículas. Las microesferas obtenidas por estos investigadores con los dos polímeros tuvieron un tamaño similar, de lo cual infieren que la masa molecular incide más fuertemente en las características de las partículas que el tipo de polímero. Los autores estudiaron además el efecto de otros parámetros experimentales (por ejemplo la velocidad de agitación durante la formación de las partículas, la concentración de PVA en la fase acuosa externa y el porcentaje de nanopartículas de magnetita) en el tamaño de las partículas y encontraron un incremento en la talla de las partículas hechas con los dos polímeros cuando: 1) el porcentaje de magnetita aumentó, 2) la concentración de PVA disminuyó y 3) la velocidad de agitación durante la formación de las partículas decreció. Zhou y cols. atribuyeron el segundo hallazgo a la acción del tensoactivo el cual previene la agregación de las nanopartículas de magnetita que de ocurrir favorece la formación de partículas de mayor tamaño.

Zhang y cols. publicaron un trabajo, también en el año 2008, acerca de la obtención de microesferas de PLGA cargadas con IFN- α 2b por la técnica de doble emulsión - evaporación del disolvente (135).

Estos autores encapsularon IFN- α 2b de Shenzhen Neptunus Interlong Bio-Tech Co, Ltd. (Shenzen, China) y varios PLGAs con diferente viscosidad inherente y comprobaron que al emplear polímeros con menor viscosidad inherente se obtenían microesferas más porosas, de menor tamaño y con una cantidad total de proteína liberada mayor. Las microesferas de IFN- α 2b obtenidas por estos autores fueron administradas en monos y se comprobó que el perfil farmacocinético de las mismas fue diferente del que se obtuvo al administrar la proteína en solución. Además el tiempo medio de residencia en sangre y el área bajo la curva de la concentración sérica de IFN- α 2b en el tiempo fue mayor cuando se administró la proteína encapsulada (135).

Un trabajo publicado en 2010 por Yang y cols., detalla la preparación de microesferas de PLGAs con IFN- α 2b de Shenzhen Neptunus Interlong Bio-Tech Co, Ltd. (Shenzen, China) (133). De forma similar al trabajo anterior, estos autores encontraron que al disminuir la viscosidad inherente del polímero utilizado para preparar las microesferas el tamaño de estas fue menor, su estructura más porosa y la cantidad total de proteína liberada aumentó; sin embargo disminuyó la carga y la eficiencia de encapsulación. Estos autores comprobaron además que las microesferas obtenidas con el polímero de viscosidad inherente igual a 0,89 dL/g, con sus condiciones de encapsulación, mostraron un perfil de liberación de IFN- α 2b *in vitro* adecuado y que la proteína liberada mantuvo una actividad biológica aceptable durante 7 días.

El trabajo más reciente, publicado en 2011 por Li y cols., describe la encapsulación de IFN- α 2b en microesferas de PLGA obtenidas por 3 variantes del método de evaporación del disolvente que se diferencian en las características de las tres fases que forman el sistema (138). El primero introduce la proteína mezclada con gelatina en forma de partículas que se dispersan en una solución del polímero y la suspensión se dispersa en otra fase oleosa inmisible con la primera. En el segundo procedimiento se prepara una solución acuosa de la proteína que se mezcla con una solución del polímero y la emulsión formada se dispersa en una segunda fase acuosa para formar la doble emulsión. El tercer procedimiento es similar al segundo pero la proteína se introduce en forma de partículas. Los autores encontraron que este último procedimiento permitió obtener microesferas de tamaño adecuado (35,4 μ m), con mayor eficiencia de encapsulación (81,41%) y un mejor perfil de liberación. Seleccionaron además las microesferas óptimas basados en el efecto producido en ellas por el tamaño de las partículas de IFN- α 2b y gelatina conjuntamente con la matriz polimérica empleada. Estas microesferas se obtuvieron con 86,01% de eficiencia de encapsulación, un diámetro promedio de 28,94 μ m y mostraron una liberación inicial de 16,69% seguida de un perfil de orden cero que alcanzó una liberación total de 83,06% a los

23 días. Un estudio farmacocinético en ratas mostró que el perfil sérico de la proteína fue modificado al encapsular el IFN- α 2b en las microesferas estudiadas.

2.4 Microesferas de PLGAs cargadas con FCE

Se han encontrado 11 artículos acerca de la encapsulación de FCE humano en microesferas poliméricas los cuales han sido publicados entre 1996 y 2010. De ellos sólo 4 describen la preparación de microesferas de FCE en matrices derivadas de los ácidos láctico y glicólico a través del método de doble emulsión - evaporación del disolvente (53, 128, 139, 140).

En el primer trabajo, publicado por Han y cols. en 2001, se describe la preparación de microesferas de poli (ácido L-láctico) cargadas con FCE de Daewoong Pharm (Seoul, South Korea) cuya liberación sostenida mejoró la cicatrización de úlceras gástricas provocadas en ratas. Los autores encontraron que el aumento de la concentración del polímero de 2,5 a 5% produjo un aumento de la eficiencia de encapsulación la cual disminuyó dramáticamente al llevar la concentración del polímero hasta 10%. Esta disminución fue atribuida al aumento excesivo de la viscosidad de la solución polimérica (139). Conjuntamente se observó una disminución de la liberación inicial de FCE en los estudios *in vitro*. Otro parámetro experimental evaluado fue la presión osmótica en la fase acuosa interna cuyo aumento generó mayor eficiencia de encapsulación y una disminución de la liberación rápida inicial. Los perfiles de liberación de FCE mostraron dos etapas bien definidas, siendo la liberación inicial una característica dependiente de la concentración del polímero, la presión osmótica y el volumen de la fase acuosa interna. Los autores consideraron que la liberación de la proteína está gobernada por la difusión puesto que la estructura de las microesferas permaneció invariable durante el período de incubación.

El trabajo publicado por Kim y cols. en 2002 demostró que la conjugación de FCE (Daewoong Pharmaceutical Co., Seoul, Korea) con PEG modifica su comportamiento frente a la encapsulación en microesferas de PLGA 50:50 (128). El principal hallazgo fue la disminución de la liberación inicial de FCE cuando el mismo se conjuga con PEG ya que la cantidad total de proteína liberada fue aproximadamente la misma: 100% en 25 días. Este efecto fue atribuido al mayor volumen hidrodinámico del FCE conjugado que dificulta su difusión a través de los poros y canales de las microesferas.

En 2006 Goraltchouk y cols. detallan la obtención de microesferas de PLGA 50:50 con FCE de Peptotech Inc (Rocky Hill, NJ, EE.UU.) para incorporarlas a minitubos de quitosana que pueden funcionar como guías para la regeneración de nervios (53). Las partículas obtenidas fueron esféricas y

con un tamaño promedio de 74,12 μm . La cantidad total de FCE liberada fue muy pequeña: 8,8% en 56 días y los autores sólo encontraron actividad biológica en las fracciones de FCE liberadas hasta 14 días.

El trabajo más reciente, publicado por Dong y cols. en 2008, refiere la obtención de microesferas de PLGA cargadas con FCE por el método de doble emulsión - evaporación del disolvente con un 86,5% de eficiencia de encapsulación (140). Las partículas obtenidas aceleraron la velocidad de crecimiento de los fibroblastos y la cicatrización más eficientemente que el FCE en solución.

2.5 Consideraciones finales

En el campo de la microencapsulación de proteínas terapéuticas, de manera general, se han estudiado las características de las microesferas obtenidas en relación con algunos parámetros experimentales y/o algunas de las propiedades de las matrices de encapsulación. Sin embargo, los resultados alcanzados no permiten hacer generalizaciones pues los mismos se encuentran muy ligados a la proteína empleada y a las demás condiciones del proceso de encapsulación que involucra una gran cantidad de variables. Por otra parte, se verifican escasamente las propiedades de la proteína encapsulada lo cual resulta esencial en la demostración de la utilidad de un sistema para ser empleado en la práctica. La mayoría de los autores sustentan en gran medida la utilidad de las microesferas que obtienen en los perfiles de liberación *in vitro* o farmacocinéticos, que aunque sean perfectos carecerían de utilidad práctica si la proteína contenida en las microesferas no ha conservado las propiedades que le permiten ejercer su actividad biológica. Debe profundizarse en el estudio del perfil de liberación *in vitro* que, si bien no refleja en toda su magnitud lo que ocurrirá *in vivo*, constituye un indicio de la capacidad que tendrán las microesferas para liberar todo su contenido en el sitio de administración. En este sentido es importante garantizar que se libere un porcentaje alto de la proteína pues es poco probable alcanzar una liberación *in vivo* mayor que *in vitro* debido a las diferencias lógicas entre estos dos medios en los cuales se depositan las partículas.

Aunque existen muchos estudios relacionados con la microencapsulación de péptidos y proteínas, son muy pocos los productos que se comercializan actualmente. Para ampliar el número de productos biofarmacéuticos basados en microesferas es necesario lograr resultados satisfactorios en varios aspectos. Por ejemplo, se requiere el desarrollo de métodos de microencapsulación escalables y que permitan encapsular estos principios activos sensibles sin afectar sus propiedades físico-químicas y biológicas. El diseño de procedimientos sencillos y adecuados para la caracterización de las biomoléculas encapsuladas es otro de los problemas que se necesita resolver. Aunque todavía queda mucho por investigar para que las formulaciones de proteínas encapsuladas en microesferas se

conviertan en formas farmacéuticas de fácil manufactura y control de calidad, constituyen sistemas de liberación muy atractivos por las ventajas que brindan, lo cual es el principal elemento que impulsa el desarrollo acelerado de este campo de investigación.

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales

El IFN- α 2b y el FCE utilizados en este trabajo fueron producidas por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba). Los polímeros PLGA 50:50 (Lactel BP-0100, $40\text{-}75 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), PLGA 50:50 (5-15 $\times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), PLGA 75:25 (Lactel-0300, $66\text{-}107 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) y PLLA (Lactel BP-0600, $85\text{-}160 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, EE.UU.). Los polímeros PLGA 50:50 (RESOMER RG 503 H, $24\text{-}38 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), PLGA 50:50 (RESOMER RG 502, $7\text{-}17 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), PLGA 50:50 (RESOMER RG 502 H, $7\text{-}17 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), PLLA (RESOMER L 206 S, $80\text{-}130 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) y P(DL)LA (RESOMER R 202 H, $10\text{-}18 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) fueron adquiridos de Boehringer-Ingelheim (Ingelheim, Alemania). El alcohol polivinílico (PVA, siglas en inglés) y los tensoactivos Pluronic F-68, Pluronic F-127, Triton X-100 y NP-40 se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). El juego de reactivos para la cuantificación de proteínas, “MicroBCATM Protein Assay Reagent Kit” fue suministrado por Pierce (Rockford, IL, EE.UU.). Los demás reactivos fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania).

3.2 Procedimiento de encapsulación

3.2.1 Variante 1

Las microesferas de PLGAs cargadas con IFN- α 2b y FCE se prepararon por la técnica de doble emulsión - evaporación del disolvente según el procedimiento descrito por Cohen y cols. en 1991 (61), al cual se le realizaron algunas modificaciones. De forma breve, 100 μL de la solución de proteína se agitaron durante 30 s con 1 mL del polímero al 10% en DCM. Para ello se usó un equipo de ultrasonido modelo IKASONIC U 200 S control (IKA Labortechnik, Alemania). La emulsión se vertió en 40 mL de alcohol polivinílico al 1% en agua y se obtuvo la segunda emulsión (w/o/w), mediante agitación durante 2 min con un dispersor Ultraturrax T8 (IKA Labortechnik, Alemania) a una velocidad de agitación de 14 000 rpm. La doble emulsión se vertió en 140 mL de PVA al 1% en agua y se agitó en un homogeneizador de paleta tipo hélice (IKA Labortechnik, Alemania) para evaporar el DCM. Finalmente, las microesferas se colectaron por filtración, se lavaron 5 veces con agua destilada (20 mL cada vez) y se secaron por congelación-deshidratación en una liofilizadora (Edwards, Reino Unido). Se obtuvieron microesferas vacías con el mismo procedimiento, pero sustituyendo la solución de proteína por agua destilada o un tampón de igual composición al empleado para almacenar las proteínas

utilizadas en este trabajo. La Figura 3.1 ilustra el procedimiento general de obtención de microesferas por la técnica de doble emulsión - evaporación del disolvente.

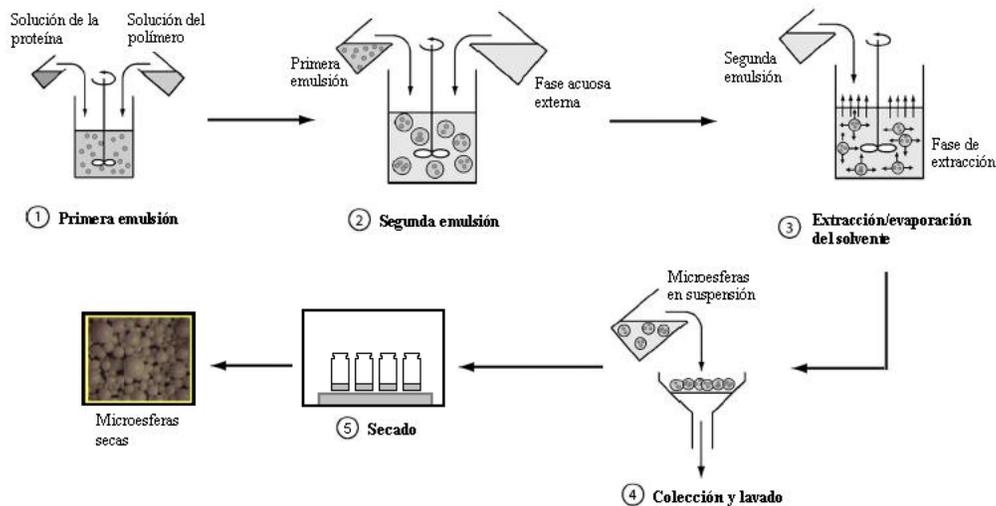


Figura 3.1. Diagrama general del proceso de obtención de las microesferas por la técnica de doble emulsión - evaporación del disolvente.

3.2.2 Variante 2

Las microesferas se prepararon también mediante una variante modificada del procedimiento descrito por Han y cols. en 2001 (139). De forma breve, 100 μL de la solución de proteína se agitaron durante 2 min con 1 mL del polímero al 5% en DCM. Para ello se usó un dispersor Ultraturax T8 (IKA Labortechnik, Alemania) con el útil de dispersión S8N-5G. La emulsión se vertió en 30 mL de PVA al 1% en agua y se obtuvo la segunda emulsión (w/o/w), mediante agitación durante 3 min con un dispersor Ultraturax T8 (IKA Labortechnik, Alemania) con el útil de dispersión S8N-8G y una velocidad de agitación de 14 000 rpm. La doble emulsión se vertió en 270 mL de PVA al 1% en agua y se agitó en un homogeneizador de paleta tipo hélice (IKA Labortechnik, Alemania) para evaporar el DCM. Finalmente, las microesferas se colectaron por filtración, se lavaron 5 veces con agua destilada (20 mL cada vez) y se secaron por congelación-deshidratación en una liofilizadora (Edwards, Reino Unido). Se obtuvieron microesferas vacías con el mismo procedimiento, pero sustituyendo la solución de proteína por agua destilada o un tampón de igual composición al empleado para almacenar las proteínas utilizadas en este trabajo.

3.3 Caracterización de las microesferas de IFN- α 2b y FCE

3.3.1 Morfología

Las microesferas secas, previamente fijadas en el portamuestras, se recubrieron con platino en un metalizador JFC-1100 (Jeol, Japón) con una corriente directa de 1,2 kV y 15 mA durante 2 min. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido (Philips Electron Optics, Holanda) operado a un voltaje de aceleración de 5kV.

3.3.2 Tamaño de las partículas

Veinte miligramos de microesferas se resuspendieron en 100 μ L de agua destilada. La suspensión se homogeneizó mediante ultrasonido durante 5 s, para desagregar completamente las partículas. Un volumen de 20 μ L de cada muestra se colocó, con cuidado, en la celda de medición del equipo de difracción por láser Coulter LS 230 (Coulter, EE.UU.). La distribución de tamaños de partícula se obtuvo mediante el empleo automatizado del modelo óptico de Fraunhofer.

3.3.3 Carga y eficiencia de encapsulación

Diez miligramos de microesferas se incubaron en 0,5 mL de NaOH (1 mol/L) a temperatura ambiente (25°C), durante 16 h y con agitación moderada. La solución se neutralizó con 1 mol/L de HCl y la concentración de la proteína se determinó por duplicado mediante el método del ácido bicinonínico utilizando el juego de reactivos para la determinación de proteínas microBCA (Pierce, EE.UU.). Este ensayo se describe en el epígrafe 3.7.1. La carga (Q) de las microesferas fue determinada dividiendo la masa de proteína, determinada mediante el ensayo de microBCA, por la masa de partículas disueltas y se expresó en porcentaje (ecuación 3.1). La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó como la proporción de la carga real de las partículas con respecto a la carga teórica y se expresó en porcentaje (ecuación 3.2). La carga teórica de la proteína fue definida como el cociente de la masa de IFN- α 2b o FCE introducida en el proceso entre la masa inicial de polímero utilizada para formar la primera emulsión, también se expresó en porcentaje (ecuación 3.3). Se asumió que la masa de proteína utilizada para microencapsular es muy pequeña con respecto a la masa de polímero.

$$Q = \frac{\text{Masa de proteína en las partículas disueltas}}{\text{Masa de partículas disueltas}} \times 100\% \quad (3.1)$$

$$EE = \frac{\text{Carga experimental (Q)}}{\text{Carga Teórica (Qt)}} \times 100\% \quad (3.2)$$

$$Qt = \frac{\text{Masa inicial de proteína}}{\text{Masa inicial de polímero}} \times 100\% \quad (3.3)$$

3.3.4 Perfil de liberación

Veinticinco miligramos de microesferas se resuspendieron en 0,5 mL de solución tampón fosfato salino, pH 7,2 (PBS) con Tween 80 al 0,001% y azida sódica al 0,1% (esta solución se denomina en lo adelante medio de liberación o fluido receptor). La suspensión se incubó a 37°C con agitación moderada. A diferentes intervalos de tiempo las microesferas se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm en una centrífuga Hettich Mikroliter modelo D-73582 (Hettich Zentrifugen, Alemania). El sobrenadante se colectó y se determinó la cantidad de IFN- α 2b o FCE presente mediante el ensayo de microBCA.

3.4 Efecto de las variables experimentales del proceso de encapsulación en las características de las microesferas obtenidas

3.4.1 Efecto de la concentración de la proteína y volumen de la fase acuosa interna

3.4.1.1 Sobre la carga y la eficiencia de encapsulación

Para evaluar el efecto de la concentración de IFN- α 2b de la fase acuosa interna sobre la carga y la eficiencia de encapsulación se obtuvieron microesferas, por la variante 1 (epígrafe 3.2.1), a partir de tres soluciones con diferente concentración de la proteína (5, 10 y 20 mg/mL). Para determinar la influencia del volumen de la fase acuosa interna sobre la carga y la eficiencia de encapsulación se prepararon microesferas a partir de dos volúmenes diferentes (50 y 100 μ L) de una solución de IFN- α 2b a una concentración de 20 mg/mL.

El efecto de la concentración de FCE y el volumen de la fase acuosa interna en la carga y la eficiencia de encapsulación fue evaluado mediante un diseño factorial completo en tres niveles (3^2). La concentración de FCE fue estudiada en tres niveles: 5, 10 y 20 mg/mL y el volumen de la fase acuosa interna también: 50, 100 y 200 μ L. Las diferentes muestras de microesferas se obtuvieron de forma aleatoria, mediante la variante 1 descrita anteriormente (ver el epígrafe 3.2.1).

Los valores de las respuestas estudiadas (EE y Q) fueron hallados en todas muestras como se describió en el epígrafe 3.3.3.

3.4.1.2 Sobre el tamaño de las partículas

El efecto de la concentración de proteína en la fase acuosa interna sobre el tamaño de las partículas fue evaluado mediante la determinación del mismo (como se describe en el epígrafe 3.3.2.) a muestras de microesferas de IFN- α 2b y FCE obtenidas con diferente concentración de la proteína (5, 10 y 20 mg/mL para el IFN- α 2b y los valores extremos de 5 y 20 mg/mL de FCE).

Para estimar el efecto del volumen de la fase acuosa interna en el tamaño de las partículas se analizaron microesferas de FCE obtenidas con 50, 100 y 200 μL de solución acuosa de la proteína.

Todas las muestras analizadas fueron fabricadas por la variante 1 descrita en el epígrafe 3.2.1 con las modificaciones propias del estudio mencionadas anteriormente.

3.4.2 Influencia de la velocidad de agitación de la segunda emulsión

Se obtuvieron microesferas de PLGA cargadas con IFN- α 2b siguiendo el procedimiento general descrito en el epígrafe 3.2.1 (variante 1) pero con tres velocidades de agitación diferentes para formar la segunda emulsión: 8 000, 14 000 y 20 000 rpm. El tamaño de las partículas se determinó como se describe en el epígrafe 3.3.2.

3.4.3 Efecto del modo de preparar la primera emulsión

Se prepararon microesferas de IFN- α 2b y FCE mediante la variante de encapsulación 1 (epígrafe 3.2.1), pero se emplearon dos formas diferentes para dispersar la fase acuosa interna en la fase orgánica: 1) *agitación mecánica* mediante un dispersor Ultraturrax T8 (IKA Labortechnik, Alemania) y 2) *agitación por ultrasonido* con un equipo de sonda modelo IKASONIC U 200 S control (IKA Labortechnik, Alemania). A continuación aparecen las condiciones de trabajo para cada forma de obtener la primera emulsión:

Agitación mecánica

Dispositivo dispersor: S8N-5G

Velocidad de agitación: 14 000 rpm

Tiempo: 2 min

Agitación por ultrasonido

Sonda: $\varnothing = 2$ mm

Amplitud: 40%

Tiempo: 30 s

Ciclo: 0,5 (pulsos de 0,5 s)

A las microesferas obtenidas se les determinó Q y el perfil de liberación de acuerdo con los procedimientos descritos en los epígrafes 3.3.3 y 3.3.4 respectivamente.

3.5 Efecto de la naturaleza de los componentes del sistema en las características de las microesferas obtenidas

3.5.1 El carácter hidrofóbico de la proteína encapsulada

Se prepararon microesferas con IFN- α 2b y FCE mediante el procedimiento descrito en el epígrafe 3.2.1 con las modificaciones correspondientes según el propósito del estudio. Estas modificaciones se especifican en los acápites correspondientes en la discusión de los resultados. Las microesferas obtenidas fueron comparadas en cuanto a Q, EE y perfil de liberación de las proteínas encapsuladas. Estos parámetros se determinaron por los métodos descritos en los epígrafes 3.3.3 y 3.3.4.

3.5.1.1 Factores que influyen en la liberación incompleta del IFN- α 2b

- Adsorción del IFN- α 2b a la matriz polimérica

La adsorción de IFN- α 2b al polímero se estudió de dos formas:

i) incubación a 37°C de una solución de concentración conocida de la proteína con microesferas de PLGA vacías

Se obtuvieron microesferas vacías mediante el procedimiento descrito en el epígrafe 3.2.1. Quince miligramos de estas microesferas se incubaron, con agitación moderada, en 300 μ L de solución de IFN- α 2b a 200 μ g/mL en PBS. A determinados intervalos de tiempo (4, 7 y 14 días) las muestras se centrifugaron, se tomó una pequeña fracción del sobrenadante (50 μ L) y se determinó la cantidad de IFN- α 2b presente por el ensayo de microBCA. Como referencia se incubó sin microesferas, en iguales condiciones, la misma solución de IFN- α 2b que se mezcló con las partículas vacías. La concentración de IFN- α 2b en la muestra de referencia también fue analizada mediante microBCA.

ii) adición de un agente tensoactivo al medio receptor utilizado para realizar el perfil de liberación

Se estudió la presencia de proteína adsorbida en la matriz polimérica en las microesferas cargadas con IFN- α 2b, mediante la incubación de las partículas en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS). En detalle, diez miligramos de microesferas con IFN- α 2b se resuspendieron en 200 μ L del medio de liberación y otra fracción de igual masa de partículas fue incubada en el medio de liberación con SDS adicionado a 5mM. Las suspensiones fueron incubadas a 37°C con agitación moderada. A determinados intervalos de tiempo (1, 4, 7 y 14 días) se centrifugaron las muestras de microesferas y se extrajo el sobrenadante, el cual fue reemplazado por igual volumen del medio de liberación correspondiente. Se determinó, mediante el ensayo de microBCA (ver el procedimiento en el epígrafe 3.7.1), la cantidad de IFN- α 2b presente en los sobrenadantes.

- Degradación de la matriz polimérica durante el período de liberación in vitro

Las microesferas, luego del período de liberación *in vitro*, se secaron mediante congelación-deshidratación y se almacenaron a 4°C. La morfología de las microesferas antes y después de la liberación fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido siguiendo el procedimiento descrito en el epígrafe 3.3.1. La masa molecular del polímero antes y después de la incubación fue determinada mediante cromatografía de permeación en gel.

Cromatografía de permeación en gel

Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución LaChrom equipado con un detector de índice de refracción (Merck, Alemania). Las microesferas, disueltas en THF, se eluyeron con este mismo solvente (a un flujo de 1 mL/min) a través de una columna TSK-GEL GMHHR-N (7,8 mm x 30 cm; 5 μ m) (TOSOH BIOSEP, Japón). La masa molecular promedio aparente se calculó con respecto a una curva patrón de poliestireno (TOSOH BIOSEP, Japón; rango de MM: 1050 – 96400 g.mol⁻¹). Estos resultados se corrigieron según la ecuación de Mark-Houwink (coeficientes Mark-Houwink en THF: $K_{\text{PLGA50:50}}=1,07 \times 10^{-2}$ mL/g, $\alpha_{\text{PLGA50:50}}=0,76$; $K_{\text{PS}}=1,41 \times 10^{-2}$ mL/g, $\alpha_{\text{PS}}=0,74$) (141).

- Formación de agregados de IFN- α 2b durante la obtención de la primera emulsión

Se adicionó a un tubo de vidrio 100 μ L de IFN- α 2b en PBS y se colocó en un baño de hielo, luego se añadió 1 mL de DCM y se emulsionó con el equipo de ultrasonido modelo IKASONIC U 200 S control (IKA Labortechnik, Alemania) durante 30 s y 1 min. Se adicionó a la emulsión 1 mL de PBS, se agitó vigorosamente en un agitador de tipo vórtice modelo MS2 S1 (IKA Works Inc., EE.UU.) y luego se centrifugó durante 5 min a 5 000 rpm en una centrífuga Hettich Mikroliter modelo D-73582 (Hettich Zentrifugen, Alemania). La fase acuosa (superior) fue extraída con cuidado de no tomar interfase o fase orgánica. El residuo fue extraído nuevamente con 1 mL más de PBS. La fase orgánica fue separada de la interfase y ambas se secaron al vacío para eliminar el DCM. El residuo de la fase orgánica fue resuspendido en 50 μ L de PBS y el de la interfase se resuspendió en 100 μ L del mismo tampón. La cantidad de IFN- α 2b presente en todas las muestras fue determinada por el ensayo de microBCA (epígrafe 3.7.1) y se analizaron además las características de la proteína mediante electroforesis en gel plano de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, siglas en inglés) y ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA, siglas en inglés) (epígrafes 3.7.4 y 3.7.2, respectivamente).

3.5.1.2 Efecto de la variación de la hidrofobicidad del FCE y el IFN- α 2b sobre las propiedades de las microesferas

Teniendo en cuenta que el FCE producido por el CIGB es una mezcla de dos especies: una de 52 aa y otra de 51 aa cuyo carácter hidrofóbico es diferente, se encapsularon tres mezclas con diferentes proporciones de las dos especies:

- FCE_{51aa} – 70,94% + FCE_{52aa} – 25,28%
- FCE_{51aa} – 64,78% + FCE_{52aa} – 31,57%
- FCE_{51aa} – 33,47% + FCE_{52aa} – 62,56%

En el caso del IFN- α 2b se encapsuló la especie nativa y tres especies derivadas de ésta cuyo carácter hidrofóbico fue modificado mediante su conjugación a diferentes moléculas de PEG:

- IFN- α 2b
- IFN- α 2b conjugado a una molécula de PEG lineal de 12×10^3 g.mol⁻¹ (IFN- α 2b-PEG₁₂)
- IFN- α 2b conjugado a una molécula de PEG de 24×10^3 g.mol⁻¹ compuesta por dos ramas de 12×10^3 g.mol⁻¹ cada una (IFN- α 2b-2PEG₁₂)
- IFN- α 2b conjugado a una molécula lineal de PEG de 40×10^3 g.mol⁻¹ (IFN- α 2b-PEG₄₀)

La encapsulación del interferón y sus derivados PEGilados se realizó mediante la variante 1 que aparece detallada en el epígrafe 3.2.1, mientras que la encapsulación del FCE se realizó mediante la variante 2 descrita en el epígrafe 3.2.2. La caracterización de las microesferas en cuanto a Q, EE y perfil de liberación de las moléculas encapsuladas se llevó a cabo como aparece en los epígrafes 3.3.3 y 3.3.4.

Para determinar la superficie hidrofóbica del FCE se utilizaron las herramientas computacionales de modelación de estructuras de proteínas. De la base de datos de estructuras de proteínas (www.pdb.org) se obtuvieron 10 modelos para el FCE de 53 aa (2KV4), los cuales están contruidos a partir de la estructura determinada por resonancia magnética nuclear (142). Con la ayuda del “WHAT IF Web Interface” (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>) se construyeron los modelos para las especies de 52 y 51 aa y se calculó el área superficial para los diferentes tipos de átomos. A partir de estos datos se calculó el área superficial hidrofóbica (ver el Anexo 2). Las imágenes de la estructura tridimensional de ambas moléculas y la distribución de superficie hidrofílica e hidrofóbica fueron obtenidas mediante el programa UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, EE.UU., <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>).

3.5.2 Las propiedades de la matriz de encapsulación

Las dos proteínas estudiadas en este trabajo fueron encapsuladas en varias matrices poliméricas con diferente composición de ácido láctico y glicólico, diferente masa molecular y grupo terminal (Tabla 3.1). El perfil de liberación se determinó según el procedimiento descrito en el epígrafe 3.3.4.

Tabla 3.1. Propiedades de las matrices poliméricas empleadas para encapsular IFN- α 2b y FCE.

Polímero	Fabricante	Composición (%)		MM* (10 ⁻³ g.mol ⁻¹)	Grupo terminal
		Ácido D,L-láctico	Ácido glicólico		
PLGA 50:50 (Lactel BP-0100)	Sigma	50	50	40 - 75	-COOR
PLGA 50:50	Sigma	50	50	5 - 15	-COOR
PLGA 75:25 (Lactel BP-0300)	Sigma	75	25	66 - 107	-COOR
PLLA (Lactel BP-0600)	Sigma	100**	0	85 - 160	-COOR
PLGA 50:50 (RESOMER RG 503 H)	Boehringer- Ingelheim	50	50	24 - 38	-COOH
PLLA (RESOMER L 206 S)	Boehringer-Ingelheim	100**	0	80 - 130	-COOH
PLGA 50:50 (RESOMER RG 502)	Boehringer Ingelheim	50	50	7 - 17	-COOR
PLGA 50:50 (RESOMER RG 502 H)	Boehringer Ingelheim	50	50	7 - 17	-COOH
PLA (RESOMER R 202 H)	Boehringer Ingelheim	100	0	10 - 18	-COOH

* Masa molecular reportada por el fabricante.

** Ácido L-láctico.

3.5.3 Efecto de aditivos co-encapsulados

Se estudió el efecto de 8 aditivos: Pluronic F-68, Pluronic F-127, Tween 20, Tween 80, manitol, trehalosa, lisina y ácido etilendiamino tetraacético (EDTA, siglas en inglés). El contenido de cada aditivo introducido en la fase acuosa interna de la doble emulsión se definió según un diseño factorial fraccionario 2⁸⁻⁴ con resolución IV (Tabla 3.2).

- Compatibilidad del IFN α -2b con los excipientes

Las soluciones de la proteína con los aditivos disueltos conjuntamente, en las proporciones expresadas en la Tabla 3.2, fueron analizadas mediante ELISA y SDS-PAGE según se describe en los epígrafes 3.7.2 y 3.7.4, respectivamente.

- Perfil de liberación

El procedimiento de encapsulación fue el mismo descrito en el epígrafe 3.2.1. El perfil de liberación de cada una de estas microesferas se determinó básicamente por el procedimiento detallado anteriormente (epígrafe 3.3.4), pero se detuvo a los 14 días.

Las variables de respuesta estudiadas fueron: 1) el porcentaje de proteína liberada durante el primer día y 2) la liberación de IFN- α 2b entre los días 1 y 14. Cada muestra del plan experimental (Tabla 3.2) fue preparada por duplicado y en orden aleatorio.

Tabla 3.2. Plan experimental de la composición de las diferentes fases acuosas a preparar.

	Lisina (mM)	Pluronic F-68 (%)	EDTA (mg/mL)	Tween 20 (mg/mL)	Manitol (%)	Pluronic F-127 (%)	Tween 80 (mg/mL)	Trehalosa (%)
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	50	0	0	0	0	5	0,5	1,5
3	0	5	0	0	1	0	0,5	1,5
4	50	5	0	0	1	5	0	0
5	0	0	0,5	0	1	5	0,5	0
6	50	0	0,5	0	1	0	0	1,5
7	0	5	0,5	0	0	5	0	1,5
8	50	5	0,5	0	0	0	0,5	0
9	0	0	0	0,5	1	5	0	1,5
10	50	0	0	0,5	1	0	0,5	0
11	0	5	0	0,5	0	5	0,5	0
12	50	5	0	0,5	0	0	0	1,5
13	0	0	0,5	0,5	0	0	0,5	1,5
14	50	0	0,5	0,5	0	5	0	0
15	0	5	0,5	0,5	1	0	0	0
16	50	5	0,5	0,5	1	5	0,5	1,5

3.6 Evaluación de la utilidad de las microesferas obtenidas para el desarrollo de formulaciones de liberación modificada

3.6.1 Caracterización de las proteínas encapsuladas

3.6.1.1 *Extracción por precipitación*

El IFN- α 2b fue extraído de las microesferas con una mezcla de solventes (DCM y acetona, 1:3 (v/v)) utilizada por Johnson y cols. para extraer la hormona de crecimiento humana de microesferas de PLGA (100). Veinte miligramos de microesferas cargadas con IFN- α 2b fueron suspendidas con 2 ml de la mezcla de solventes, primero en un agitador de tipo vórtice modelo MS2 S1 (IKA Works Inc., EE.UU.) durante 1 min y luego durante 20 min en un balancín Roto-Shake Genie (Scientific Industries Inc., EE.UU.). La suspensión resultante se centrifugó 5 min a 5000 rpm en una centrífuga Hettich Mikroliter modelo D-73582 (Hettich Zentrifugen, Alemania). El sobrenadante fue desechado y el sólido fue resuspendido y extraído nuevamente con 2 mL de la mezcla de solventes. La suspensión fue centrifugada y el sólido fue secado por congelación-deshidratación luego de desechar el sobrenadante. El residuo seco fue resuspendido en 100 μ L de PBS. La cantidad de proteína extraída se cuantificó mediante el ensayo de microBCA y las propiedades de la misma fueron evaluadas mediante SDS-

PAGE, cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC, siglas en inglés), reconocimiento inmunoenzimático por los anticuerpos del ELISA y titulación antiviral.

3.6.1.2 Extracción mediante un sistema de dos fases líquidas no miscibles

El procedimiento básico para la extracción de las proteínas encapsuladas mediante un sistema de dos fases líquidas no miscibles emplea DCM como fase orgánica y PBS como fase acuosa. De forma breve, 10 mg de microesferas se resuspendieron en 0,5 mL de DCM mediante agitación vigorosa por 30 s en un agitador de tipo vórtice modelo MS2 S1 (IKA Works Inc., EE.UU.). Luego se agitaron por 10 min en un balancín modelo Roto-Shake Genie (Scientific Industries Inc., EE.UU.). A la mezcla obtenida se le adicionó un volumen de 250 μ L de la fase acuosa y se agitó vigorosamente durante 30 s en el agitador de tipo vórtice. La emulsión obtenida se centrifugó durante 20 min a 5 000 rpm en una centrífuga Hettich Mikroliter modelo D-73582 (Hettich Zentrifugen, Alemania) para favorecer la separación de las fases. La fase acuosa se recuperó cuidadosamente con la ayuda de una micropipeta y se transvasó a un microtubo de ensayo de 0,5 mL. A la fase orgánica remanente se le adicionó otro volumen de la fase acuosa (250 μ L) y se realizó nuevamente la extracción. La fase acuosa obtenida luego de la segunda extracción se mezcló con la primera y la muestra (500 μ L) se almacenó a 4°C hasta el momento de su cuantificación y análisis.

De acuerdo con el propósito de cada estudio particular la fase acuosa puede tener otra composición, la cual será descrita según corresponda.

- Compatibilidad de las proteínas con los tensoactivos estudiados. Selección de la fase de extracción

Para evaluar la compatibilidad de las proteínas utilizadas con las sustancias tensoactivas a estudiar como posibles aditivos para aumentar la recuperación de las proteínas en la fase acuosa del sistema de extracción, se prepararon soluciones de IFN- α 2b y FCE en presencia de los tensoactivos. La concentración de cada proteína en dichas mezclas fue determinada por el ensayo de microBCA y sus propiedades fueron evaluadas mediante las técnicas de ELISA y RP-HPLC.

Las sustancias tensoactivas evaluadas fueron: SDS, Tritón X-100, NP-40, Tween 20, Tween 80, Pluronic F-68 y Pluronic F-127. Todos se emplearon a una concentración de 0,1%. La fase de extracción sin aditivo (PBS) se tomó como referencia del estudio.

Los valores de concentración obtenidos por el ensayo de microBCA y por la técnica de ELISA fueron el resultado de la determinación, por duplicado, de 4 réplicas preparadas de forma independiente, en días diferentes. La comparación de las medias de la concentración de proteína de los 8 grupos

experimentales se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). En el caso en que se detectaron diferencias entre los grupos, se realizó la prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para conocer específicamente en qué pares de grupos se encontraban tales diferencias.

- Efectividad de la extracción de las proteínas encapsuladas con la adición de una sustancia tensoactiva en la fase acuosa

En el caso del IFN- α 2b se evaluaron 5 lotes experimentales mediante la extracción empleando PBS sin tensoactivo y con SDS al 0,1% como fase acuosa. Se comparó el recobrado de la proteína determinado por los dos sistemas de extracción mediante una prueba t_{student} . Las muestras de cada extracción fueron analizadas mediante SDS-PAGE para comprobar el aumento de la cantidad de proteína extraída al incluir SDS en la fase acuosa. Se determinó además si existían cambios en las propiedades del IFN- α 2b debidas al procedimiento de extracción; para ello se evaluó, mediante ELISA y RP-HPLC, una muestra construida con microesferas vacías y una cantidad conocida de la proteína. Como referencia se empleó una solución de IFN- α 2b de concentración similar a las muestras. Se incluyó también una muestra de microesferas cargadas con IFN- α 2b.

La efectividad de incluir el Pluronic F-68 en el sistema de extracción, diseñado para la caracterización del FCE encapsulado, fue comprobada mediante la comparación de la proteína recuperada en varias muestras tratadas en presencia o no del tensoactivo en la fase acuosa. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t_{student} . Como referencia de la cuantificación adecuada del FCE mediante el ensayo de microBCA y ELISA se utilizó una solución de concentración conocida de la proteína. Se verificó además que el procedimiento de extracción no introduce cambios adicionales en las propiedades del FCE. Para ello se preparó una muestra de microesferas vacías con FCE adicionado, que posteriormente se secó y se extrajo mediante el procedimiento diseñado. Las características del FCE tratado fueron evaluadas por las técnicas siguientes: ELISA, RP-HPLC y actividad biológica.

- Caracterización de las proteínas encapsuladas mediante su extracción por un sistema de dos fases líquidas no miscibles

Se evaluó el reconocimiento inmunoenzimático del IFN- α 2b encapsulado en siete muestras que fueron extraídas mediante el sistema de dos fases con SDS al 0,1% en la fase acuosa. Se utilizó una muestra de IFN- α 2b sin encapsular como referencia. La presencia de modificaciones químicas en la proteína fue investigada mediante RP-HPLC (epígrafe 3.7.5) y la actividad biológica mediante el ensayo de actividad antiviral descrito en el epígrafe 3.7.6. También se analizó la presencia de agregados de la

proteína mediante el análisis densitométrico del gel resultante de la electroforesis realizada a las muestras según aparece en acápite 3.7.4).

Las características del FCE encapsulado se evaluaron en tres lotes experimentales de microesferas de PLA mediante el análisis de la proteína extraída por ELISA, RP-HPLC y actividad biológica de acuerdo con los procedimientos experimentales detallados en los epígrafes 3.7.3, 3.7.5 y 3.7.7, respectivamente.

3.6.2 Evaluación in vivo de las microesferas cargadas con IFN- α 2b y FCE

3.6.2.1 Interferón alfa-2b

Para estudiar *in vivo* las propiedades de las microesferas cargadas con IFN- α 2b como sistema de liberación modificada de la proteína se realizó una evaluación farmacocinética exploratoria de las mismas. Para ello, se usaron microesferas poliméricas de PLGA 50:50 (MM: 40 000-75 000 g.mol⁻¹) (Sigma, EE.UU.), las cuales contenían 0,66% de IFN- α 2b. Se utilizaron conejos machos Nueva Zelanda de 1,5 kg de peso promedio. A seis animales se les administró, por la vía subcutánea, una dosis de microesferas equivalente a 200 μ g de IFN- α 2b por animal. Para inyectar las micropartículas, estas fueron resuspendidas en un vehículo apropiado (carboximetilcelulosa al 0,3%, NaCl al 0,9% y Tween 20 al 0,1%.) en el momento de la aplicación. A determinados intervalos de tiempo se le extrajo sangre a los animales y la concentración de IFN- α 2b en suero se determinó mediante el ELISA descrito en el epígrafe 3.7.2. Como referencia se administró, por la misma vía, IFN- α 2b libre a otro grupo de 6 animales.

3.6.2.2 FCE

- Evaluación farmacocinética exploratoria

Para realizar el estudio se utilizaron conejos machos Nueva Zelanda con un peso promedio de 1,5 kg. Se emplearon microesferas de PLA (MM: 85 000 – 160 000) (Sigma, EE.UU.) cargadas con FCE al 0,39%. Para inyectar las micropartículas, éstas fueron resuspendidas en un vehículo apropiado (carboximetilcelulosa al 0,3%, NaCl al 0,9% y Tween 20 al 0,1%.) en el momento de la aplicación que se realizó por la vía subcutánea a 6 animales. La cantidad de FCE administrado fue de 300 μ g por animal en cada grupo experimental. A determinados intervalos de tiempo se le extrajo sangre a los animales y la concentración de FCE en suero se determinó mediante el ELISA descrito en el epígrafe 3.7.3. Como referencia se administró, por la misma vía, 300 μ g de FCE libre a otro grupo de 6 animales.

- Evaluación farmacodinámica exploratoria

Se utilizaron ratas Wistar, machos, con un peso entre 250-300 g. A las mismas se les indujeron heridas (dos por animal) controladas de grosor total de 1 cm², paravertebrales, simétricas y equidistantes.

Los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

- dosis única de 75 µg de FCE encapsulado en las microesferas
- dosis única de microesferas vacías (igual masa que las partículas cargadas con FCE)
- tres dosis de 75 µg de FCE libre administradas en días alternos (HeberProt-P)
- tres dosis administradas en días alternos del placebo del HeberProt-P
- sin tratamiento

En cada grupo se incluyeron 6 animales. El volumen de cada una de las formulaciones (1 mL) se dividió en 5 fracciones de 200 µL de las cuales se inyectó una en el centro de la herida y las restantes en 4 puntos del borde.

Al finalizar el estudio (9 días) se tomaron muestras de las heridas y de cada una se preparó un corte histológico con la tinción Tricrómica de Picro Mallory para evaluar la existencia de eventos correspondientes a procesos de cicatrización y otro corte teñido con Hematoxilina-Eosina para observar la presencia de elementos indicadores de reacción a cuerpo extraño.

3.7 Técnicas analíticas empleadas en la evaluación *in vitro* e *in vivo* del IFN-α2b y el FCE

3.7.1 Cuantificación de Interferón alfa-2b y FCE por microBCA

Este ensayo se realizó mediante un juego de reactivos “Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit” (Pierce, EE.UU.) y se siguió el procedimiento indicado por el fabricante. De forma abreviada, se adicionaron en dos pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos 150 µL del blanco y de las muestras, las cuales se diluyeron apropiadamente para que su concentración aproximada se encontrara entre 2 y 20 µg/mL. A cada pocillo empleado se le agregaron 150 µL del reactivo de trabajo preparado previamente según se indica más adelante. La placa se cubrió con su tapa y se incubó a 37°C durante 2 h. Al término de este tiempo la placa se dejó enfriar por 10 min y luego se leyó la absorbancia a 540 nm en un lector de placas Multiscan (Merck, Alemania). Los valores de concentración se determinaron con la ayuda de una curva de calibración con un material de referencia de albúmina de suero bovino para las muestras de IFN-α2b; mientras que para la cuantificación de las muestras de FCE fue preciso emplear un material de referencia de la misma proteína.

Preparación del reactivo de trabajo: Se mezclaron 25 partes del reactivo MA, 24 partes del reactivo MB y una parte del reactivo MC. Se agitó bien la mezcla y se utilizó en el momento o hasta 24 h después de su preparación, almacenada a temperatura ambiente (25°C).

3.7.2 Cuantificación de Interferón alfa-2b por ELISA

Este ensayo se realizó mediante el procedimiento descrito por Santana y cols. en 1999 (143). De forma breve, cada pocillo de la placa se recubrió con 100 µL de anticuerpo monoclonal anti IFN-α2b CBIFNA 2.3 (CIGB, Cuba) a 15 µg/mL en solución tampón de recubrimiento (0,05 M de Na₂CO₃ y 0,05 M de NaHCO₃, pH 9,6) y se incubó a 37°C durante 3 h. La placa se lavó una vez con la solución de lavado (Tween 20 al 0,05% en PBS). A continuación, 100 µL de las muestras diluidas, de forma adecuada, en la solución tampón de ensayo (leche deslipidizada al 0,5% en PBS) se adicionaron a los pocillos y la placa se incubó a 37°C durante 30 min. La placa se lavó 5 veces con la solución de lavado. Posteriormente se adicionó, a cada pocillo, 70 µL de otro anticuerpo monoclonal (CBIFNA 2.4) contra IFN-α2b conjugado con peroxidasa de rábano picante (CIGB, Cuba) diluido 1:10 000 (v/v) en la solución tampón de ensayo. La placa se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 1 h y se lavó 8 veces. El revelado de la placa se llevó a cabo mediante la adición de 100 µL de la solución reveladora (5 mg de o-fenilendiamina y 5,5 µL de H₂O₂ en 11 mL de solución tampón del sustrato (0,1 M de NaHPO₄, 0,048 M de ácido cítrico monohidratado, pH 5,5)). La reacción se detuvo mediante la adición, a cada pocillo, de 50 µL de H₂SO₄ (2,5 M). La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de placas Multiscan (Merck, Alemania). Para obtener la curva de regresión se emplearon soluciones, de concentraciones entre 0,2 y 10 ng/mL, de un estándar de IFN-α2b (CIGB, Cuba).

3.7.3 Cuantificación de FCE por ELISA

Este análisis fue descrito por Martínez y cols. (144). Cada pocillo de la placa se recubrió con 0,2 µg/mL de anticuerpo monoclonal anti FCE CB EGF1 (CIGB, Cuba), en 0,1 mL de solución tampón de recubrimiento (0,05 M Na₂CO₃, 0,05 M Na₂HCO₃, pH 9,6) y se incubó por 3 h at 37°C. La placa se lavó dos veces con (Tween 20 al 0,05% (v/v) en agua). Entonces, 100 µL de las muestras diluidas, de forma adecuada, en la solución tampón de ensayo (leche deslipidizada al 0,5% en PBS) se adicionaron a los pocillos y la placa se incubó a 37°C durante 1 h. La placa se lavó 5 veces con la solución de lavado. Posteriormente, se adicionaron, a cada pocillo, 80 µL de otro anticuerpo monoclonal anti FCE, CB EGF2 conjugado con peroxidasa de rábano picante (CIGB, Cuba), diluido 1:8 000 (v/v) en la solución tampón de ensayo. La placa se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 1 h y se lavó 8 veces. El revelado de la placa se llevó a cabo mediante la adición de 100 µL de la solución reveladora (5 mg de o-fenilendiamina y 5,5 µL de H₂O₂ en 11 mL de solución tampón del sustrato (0,1 M de

NaHPO₄, 0,048 M de ácido cítrico monohidratado, pH 5,5)). La reacción se detuvo mediante la adición, a cada pocillo, de 50 µL de H₂SO₄ (2,5 M). La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de placas Multiscan. Para obtener la curva de regresión se emplearon soluciones, de concentraciones entre 0,3 y 10 ng/mL, de un estándar de FCE (CIGB, La Habana, Cuba).

3.7.4 Electroforesis de IFN- α 2b en gel plano de poliacrilamida

Las muestras se analizaron en un gel al 12,5% de poliacrilamida, básicamente como describió Laemmli en el año 1970 (145). Las muestras se diluyeron 1:5 en solución tampón Tris-HCl (625 mM), pH 6,8, con SDS al 5%, glicerina al 50%, 50 mM de ditiotreitól y bromofenol azul al 0,025%. Al concluir la corrida, las muestras se visualizaron mediante su tinción con azul de Coomassie. El análisis densitométrico de la imagen digitalizada del gel se realizó mediante el programa Molecular Analyst versión 1.4.1 (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).

3.7.5 Análisis de IFN- α 2b y FCE mediante RP-HPLC

El análisis se llevó a cabo en una columna (5 µm, 250 x 4,6 mm) C8 (octil, de poro ancho) de Vydac (Hesperia, EE.UU.). La elución se realizó con un flujo de 0,8 mL/min con un gradiente de A en B especificado en cada Figura según corresponde (A: ácido trifluoroacético al 0,05% en acetonitrilo; B: ácido trifluoroacético al 0,1% en agua). La detección de las proteínas se realizó a 226 nm con procesamiento automático de los datos, mediante el sistema D-7000 Multi HSM (Merck, Alemania).

3.7.6 Actividad biológica del IFN- α 2b

La actividad antiviral del IFN- α 2b se evaluó mediante la cuantificación de la inhibición del efecto citopático producido por el virus Mengo sobre células Hep-2 (ATCC No. CCL23), de acuerdo con el procedimiento descrito por Ferrero y cols. en 1994 (146). Brevemente, una monocapa de células se incubó, en una atmósfera de CO₂ al 3% y 95% de humedad relativa, en cada pocillo de la microplaca durante 24 h a 37°C con las muestras de IFN- α 2b. El interferón se diluyó de forma apropiada en medio esencial mínimo con suero fetal bovino al 2% y gentamicina a 40 µg/mL. El virus (10⁷ TCID) se adicionó a cada pocillo y la placa se incubó en las mismas condiciones hasta que el efecto citopático (90% de lisis) se observó en el pocillo control; ello ocurrió después de un período de 18-20 h. El grado de destrucción de la monocapa celular se midió después de fijar y teñir las células remanentes con violeta cristal. La determinación del efecto citopático se realizó en un sistema ultramicroanalítico "SUMA" (Tecnosuma, Cuba). La unidad de actividad antiviral se definió como el recíproco de la dilución de la muestra que produce el 50% de protección de la monocapa de células contra el efecto citopático del virus. Los valores de título antiviral (expresados en unidad internacional) de las muestras

se obtuvieron de forma automatizada, con respecto a un material de referencia secundario calibrado contra el estándar internacional de IFN- α 2b 60/19 de la Organización Mundial de la Salud.

3.7.7 Actividad biológica del FCE

La actividad biológica del FCE se evaluó mediante la cuantificación de la actividad inductora de proliferación de células 3T3 A31. El método se basa en la capacidad del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante de inducir proliferación en células 3T3 A31. La cuantificación se realiza mediante el método de absorción del colorante cristal violeta por las células vivas. El resultado se expresa en Unidades Internacionales/mL debido a que se emplea un material de referencia de laboratorio el cual fue calibrado con la preparación de referencia internacional de FCE 91/530 del Instituto Nacional para los Controles y Estándares Biológicos del Reino Unido (NIBSC).

3.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó mediante el programa Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., EE.UU.).

4 Resultados y Discusión

El proceso de obtención de las microesferas mediante la técnica de doble emulsión - evaporación del disolvente consta de 5 etapas bien definidas, como se ilustró de forma resumida en la Figura 3.1: *i*) formación de la primera emulsión, *ii*) formación de la segunda emulsión, *iii*) evaporación del disolvente, *iv*) colección y lavado de las microesferas y *v*) secado. El proceso requiere de 20 h para su culminación; siendo la etapa de secado la más larga, con una duración aproximada de 18 h.

Los estudios morfológicos de las micropartículas revelan características importantes tales como: forma; regularidad de la superficie; presencia de poros y uniformidad de su distribución en las partículas, así como el tamaño de los mismos; homogeneidad del tamaño de las partículas; presencia de defectos; agregación y permite tener una idea de su tamaño aunque no es la técnica preferida para determinarlo.

Todas estas características tienen repercusión en las propiedades y aplicaciones de las micropartículas obtenidas. Por ejemplo, la presencia de agregación resulta indeseable ya que afecta la homogeneidad del producto elaborado; además en el caso que se desee inyectar las partículas, se pueden tupidar las agujas. Por otra parte, la cantidad y tamaño de los poros puede incidir en la liberación de la sustancia encapsulada y hasta modificar el mecanismo por el cual ocurre dicha liberación.

Como resultado de la encapsulación, en matrices de PLGAs, de las dos proteínas empleadas en este trabajo se obtuvieron partículas esféricas, de superficie regular con poros aleatoriamente distribuidos (Figura 4.1). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores que han encapsulado IFN- α 2b (54, 133, 135) y FCE (53, 128, 139) en estas mismas matrices por medio de la técnica de doble emulsión - evaporación del disolvente.

De forma general, las microesferas con IFN- α 2b tuvieron mayor tamaño que las de FCE preparadas con las mismas condiciones experimentales. Esto pudiera deberse a que la composición de la fase acuosa interna no es la misma pues el FCE empleado para obtener las microesferas mostradas en la Figura 4.1 se encontraba disuelto en agua mientras que el IFN- α 2b estaba disuelto en PBS. La presencia de sales en la fase acuosa interna hace que exista un gradiente de concentración de estas sustancias entre la fase acuosa interna y la fase externa, lo que favorece el flujo de agua hacia la fase acuosa interna durante la formación de las partículas. Este fenómeno provoca que el tamaño de las microesferas sea mayor (139).

En algunas preparaciones de microesferas de PLGA 50:50 cargadas con IFN- α 2b se encontraron pequeños defectos (Figura 4.2), probablemente generados durante su formación. Estos defectos son

causados generalmente por la extracción rápida del disolvente contenido en las gotículas formadas al dispersar la primera emulsión, que son las precursoras de las microesferas. Algunos autores han propuesto la adición de una cantidad del disolvente a la fase acuosa externa, con el objetivo de disminuir la velocidad de extracción de este. Sin embargo, en nuestro caso, ello no es recomendable porque la sustancia que se encapsula es una proteína y puede disminuir la eficiencia de encapsulación, como describieron Cleland y cols. en 1997 (147).

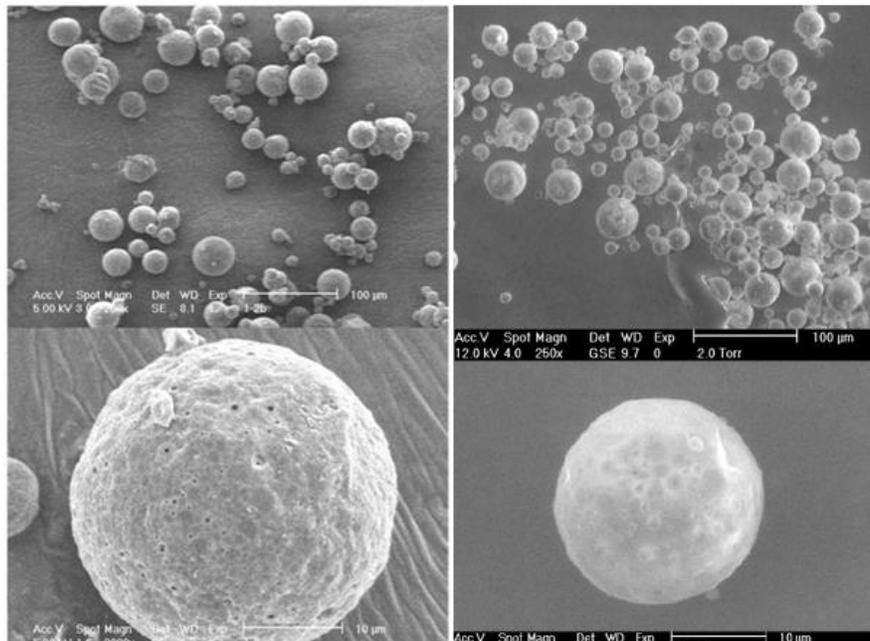


Figura 4.1. Micrografías de microesferas de PLGA cargadas con IFN- α 2b (izquierda) y FCE (derecha), obtenidas por el método de doble emulsión - evaporación del disolvente. Las partículas con IFN- α 2b son más grandes (diámetro promedio: $28.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$) que las microesferas cargadas con FCE (diámetro promedio: $18.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$).

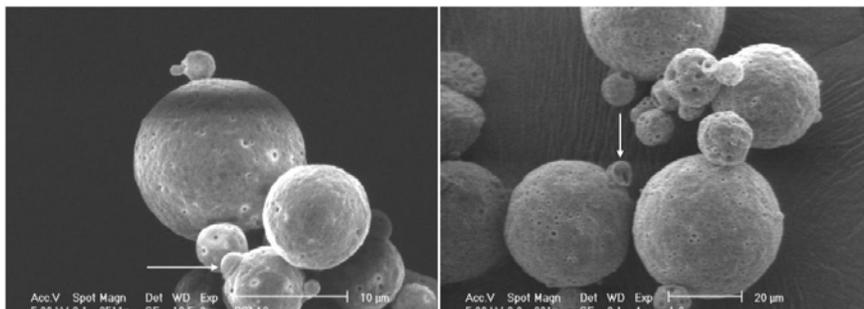


Figura 4.2. Micrografías de microesferas de PLGA cargadas con IFN- α 2b, que muestran algunos defectos (señalados con flechas) probablemente generados durante su formación.

4.1 Efecto de las variables experimentales del proceso de encapsulación en las características de las microesferas obtenidas

La microencapsulación de una proteína es un proceso complejo en el que las características del producto final dependen, de manera notable, de un conjunto grande de factores. Específicamente, en la microencapsulación mediante doble emulsión - evaporación del disolvente, se obtienen partículas con características que dependen en gran medida de los factores que intervienen en las etapas de formación de las emulsiones; por ejemplo: la concentración del polímero y de la sustancia a encapsular, del volumen de la fase acuosa interna y la concentración de sales presentes en ella, la forma de hacer las emulsiones (equipo, dispositivo, velocidad y tiempo de agitación), entre otros (9, 10, 89, 148).

En este trabajo se estudió el efecto de varios parámetros experimentales de la encapsulación en algunas de las características de las partículas que, por su importancia, definen la utilidad del sistema para ser empleado en el diseño de productos biofarmacéuticos de avanzada. Por ejemplo, la carga, la eficiencia de encapsulación, el tamaño de las partículas y el perfil de liberación de la proteína encapsulada.

4.1.1 Efecto de la concentración de la proteína y volumen de la fase acuosa interna

4.1.1.1 *Sobre la carga y la eficiencia de encapsulación*

Al estudiar el efecto de la concentración de IFN- α 2b en la fase acuosa interna sobre la eficiencia de encapsulación y la carga de las microesferas, se encontró que al emplear soluciones más concentradas de la proteína, se encapsuló mayor cantidad de esta, aunque con menor eficiencia en el proceso de encapsulación (Figura 4.3).

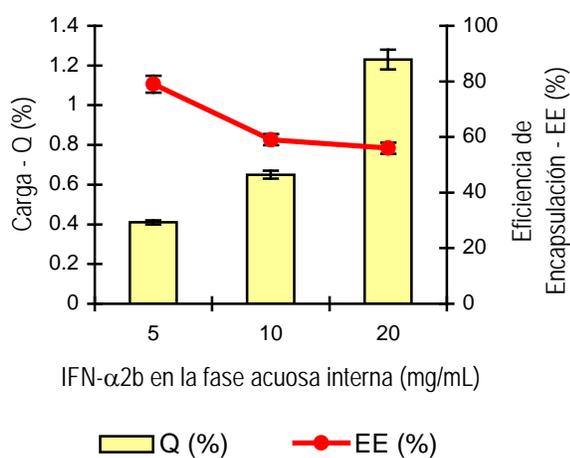


Figura 4.3. Efecto de la concentración de IFN- α 2b en la fase acuosa interna sobre la carga y la eficiencia de encapsulación de las microesferas obtenidas por el método de doble emulsión - evaporación del disolvente.

El efecto de la concentración de la proteína sobre la eficiencia de encapsulación coincide con lo descrito por otros autores al encapsular albúmina sérica humana (82) y albúmina de suero bovino (149).

También se estudió el efecto del volumen de la fase acuosa interna sobre la eficiencia de encapsulación y se observó que al dispersar 50 μL de IFN- α 2b en la solución polimérica fue posible encapsular el $66 \pm 1\%$ ($n=5$) de la proteína mientras que al duplicar el volumen de la solución de IFN- α 2b la eficiencia de encapsulación disminuyó a $56 \pm 2\%$ ($n=13$). Una observación similar ha sido reportada por otros investigadores (75, 82, 149).

Para evaluar el efecto de estas dos variables (concentración de proteína y volumen de la fase acuosa interna) en las características de las microesferas de FCE obtenidas se utilizó un diseño factorial completo 3^2 . Se determinó el valor de Q y EE a muestras elaboradas con diferentes combinaciones de valores para la concentración de FCE y para el volumen de la fase acuosa interna de acuerdo con los niveles seleccionados para cada variable independiente estudiada (ver el epígrafe 3.4.1.1 del Capítulo de Materiales y Métodos).

En la Tabla 4.1 aparecen los valores de Q y EE calculados para cada variante. De manera general se aprecia que el aumento de la concentración y el volumen favorecen la obtención de microesferas con mayor carga en tanto que la eficiencia de encapsulación experimenta una disminución. El efecto de la concentración de la proteína sobre la eficiencia de encapsulación coincide con lo descrito por otros autores (82, 149) y también con lo obtenido en este trabajo al estudiar las microesferas cargadas con IFN- α 2b.

Tabla 4.1. Factores experimentales y características de las microesferas de PLGA cargadas con FCE.

No.	Condiciones experimentales		Características de las microesferas	
	FCE (mg/mL)	Volumen (μL)	Q (%)	EE (%)
1	5	50	0,24	96
2	10	50	0,29	58
3	20	50	0,58	58
4	5	100	0,35	70
5	10	100	0,56	56
6	20	100	0,96	48
7	5	200	0,74	74
8	10	200	1,09	54
9	20	200	1,85	46

De forma similar a lo encontrado para el IFN- $\alpha 2b$, se observó que la eficiencia de encapsulación del FCE disminuyó al aumentar el volumen de la fase acuosa interna empleada para formar la primera emulsión.

Para conocer la contribución independiente de cada una de las variables así como de las interacciones de las mismas sobre las características de las microesferas, se realizó el análisis del diseño experimental factorial 3^2 para cada una de las respuestas mediante el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., EE.UU.). El ANOVA realizado para evaluar el efecto de las variables experimentales sobre la carga de las microesferas arrojó que todos los coeficientes del modelo son significativamente diferentes de cero ($p < 0,05$) y, que todos los efectos ejercen una influencia positiva en la variable respuesta (Figura 4.4).

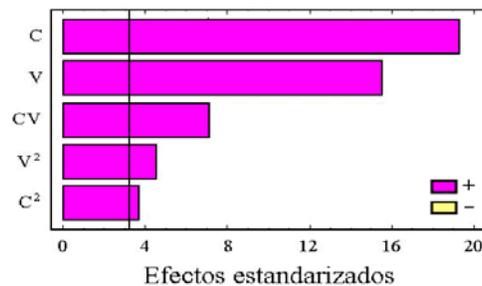


Figura 4.4. Representación de Pareto estandarizada para la carga. La línea vertical indica el umbral de significación de los efectos.

La siguiente ecuación describe la relación matemática de la carga con la concentración de FCE (C), y el volumen de la fase acuosa interna (V):

$$Q = 0,53 + 0,43 C + 0,34 V + 0,18 C^2 + 0,19 CV + 0,14 V^2 \quad (4.1)$$

La superficie de respuesta para Q en función de la concentración de FCE y el volumen de la fase acuosa interna indica que los valores máximos para esta respuesta se obtienen cuando se emplean las soluciones más concentradas de la proteína y un mayor volumen de las mismas (Figura 4.5).

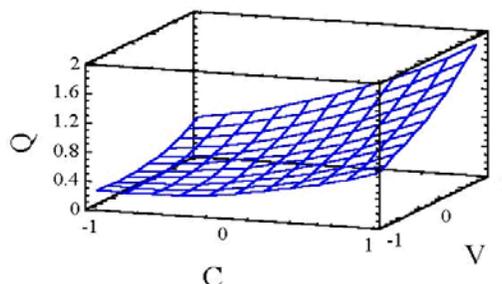


Figura 4.5. Superficie de respuesta para la carga en función de la concentración de FCE y del volumen de la fase acuosa interna.

Al analizar el efecto de las variables experimentales en la eficiencia de encapsulación, el ANOVA arrojó que sólo el volumen de la solución de FCE, de forma independiente, ejerce un efecto negativo estadísticamente significativo en esta característica ($p < 0,05$), lo que indica que emplear menor volumen de la fase acuosa interna se logra mayor eficiencia de encapsulación. Los demás efectos no influyen significativamente en la respuesta estudiada (Figura 4.6). El efecto negativo del volumen en la eficiencia de encapsulación ha sido referido por otros autores (81, 88, 97) y pudiera estar relacionado con la estructura de las microesferas, la cual tiende a presentar mayor cantidad de poros y canales mientras mayor es el volumen de la fase acuosa interna. Este fenómeno pudiera facilitar la migración de la proteína hacia la fase acuosa externa durante el proceso de obtención de las microesferas.

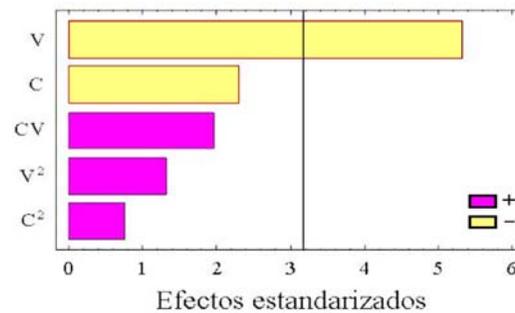


Figura 4.6. Representación de Pareto estandarizada para la eficiencia de encapsulación. La línea vertical indica el umbral de significación de los efectos.

La siguiente ecuación describe la relación matemática entre la eficiencia de encapsulación y el volumen de la solución de FCE:

$$EE = 51,78 - 14,66 V \quad (4.2)$$

La superficie de respuesta para EE en función de la concentración de FCE y el volumen de la fase acuosa interna indica que los valores máximos para esta respuesta se obtienen cuando se emplea menor volumen de las soluciones de FCE menos concentradas (Figura 4.7).

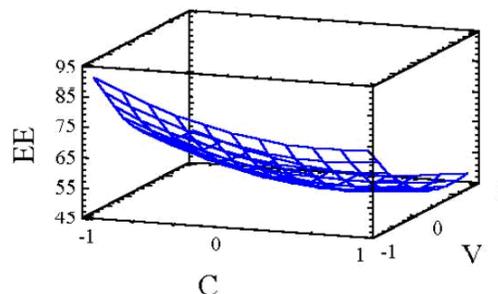


Figura 4.7. Superficie de respuesta para la eficiencia de encapsulación en función de la concentración de FCE y del volumen de la fase acuosa interna.

De los estudios realizados se obtuvo que el aumento de ambos parámetros experimentales permite obtener microesferas con mayor cantidad de proteína encapsulada por masa de partículas (Q) pero con una eficiencia menor en la encapsulación. Dado que las proteínas son fármacos de un gran valor agregado resulta beneficioso disponer de un proceso lo más eficiente posible, para reducir al máximo la cantidad de proteína que queda sin encapsular. Teniendo en cuenta esta consideración resulta recomendable trabajar con soluciones de proteína con valores de concentración cercanas al mínimo estudiado en este trabajo (5 mg/mL), siempre que la carga que se obtenga satisfaga la dosis del principio activo que debe ser administrada en una cantidad dada de microesferas.

No obstante disponer de la ecuación matemática que relaciona a las respuestas estudiadas con las variables experimentales constituye la vía más precisa para seleccionar los valores de dichas variables dependiendo de las características que se desea lograr en una muestra particular de microesferas.

4.1.1.2 Sobre el tamaño de las partículas

La variación de la concentración del IFN- α 2b en la fase acuosa interna de la primera emulsión no ocasionó diferencia significativa ($p = 0,11$) en el tamaño de las microesferas obtenidas, el cual fue de 27,5, 27,8 y 28,7 μm para las partículas obtenidas con IFN- α 2b a 5, 10 y 20 mg/mL respectivamente.

La variación de la concentración de FCE en la fase acuosa interna de la primera emulsión tampoco influyó significativamente en el tamaño de las partículas (18,03 y 17,96 μm para 5 y 20 mg/mL de FCE en la fase acuosa interna, respectivamente). Sin embargo, a medida que aumentó el volumen de la fase acuosa interna se produjo un ligero aumento del tamaño promedio de las microesferas preparadas con FCE (Figura 4.8).

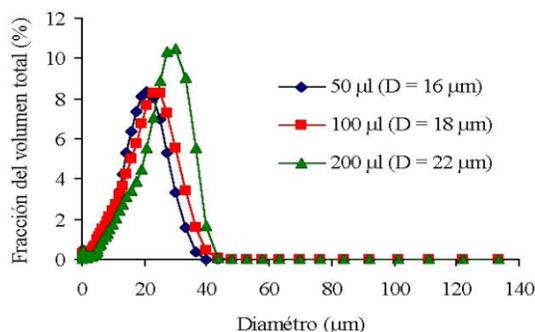


Figura 4.8. Efecto del volumen de la fase acuosa interna sobre el tamaño de las microesferas de PLGA con FCE obtenidas por el método de doble emulsión - evaporación del disolvente. D: Diámetro promedio.

Este efecto ha sido encontrado también por otros autores: 1) Parikh y cols. observaron un aumento del tamaño de microesferas de PLGA cargadas con 5-fluorouracilo al aumentar el volumen de la fase interna de 0,75 a 1 mL (150) y 2) Al-haushey y cols. encontraron sólo un ligero aumento del diámetro de las partículas al aumentar el volumen de la solución de albúmina de suero bovino desde 0,3 hasta 1 ml (149). Este fenómeno puede deberse a que el tamaño de las gotas de la primera emulsión puede aumentar con el incremento de volumen de la fase acuosa interna, lo cual puede generar, a su vez, un aumento en la talla de las partículas (150).

En cuanto a este último factor, se decidió trabajar en lo adelante con 100 μ L de la fase acuosa interna que es el valor medio del rango estudiado.

4.1.2 Influencia de la velocidad de agitación de la segunda emulsión

La velocidad a la cual se prepara la segunda emulsión es uno de los factores que más afecta el tamaño de las partículas (9, 84). En la Figura 4.9 se observa que al incrementar la velocidad de agitación (de 8 000 a 20 000 rpm) se redujo el tamaño de microesferas de PLGA cargadas con IFN- α 2b. Este efecto ha sido observado también por otros investigadores (82, 84, 99, 149). Específicamente al formar la emulsión mediante agitación a 8 000 rpm se obtuvieron partículas esféricas con un diámetro promedio de 60 μ m (determinado por difracción láser, como se describe en el acápite 3.3.2) (Figura 4.9) pero se identificaron poblaciones minoritarias de partículas con un diámetro mayor de 180 μ m, que es el tamaño considerado como límite para microesferas que van a ser administradas por la vía subcutánea o intramuscular (76, 77). La Figura 4.9 también muestra que las microesferas obtenidas a velocidades mayores (14 000 o 20 000 rpm) tuvieron menor diámetro (28 μ m y 21 μ m respectivamente) y no presentaron poblaciones de micropartículas de mayor tamaño.

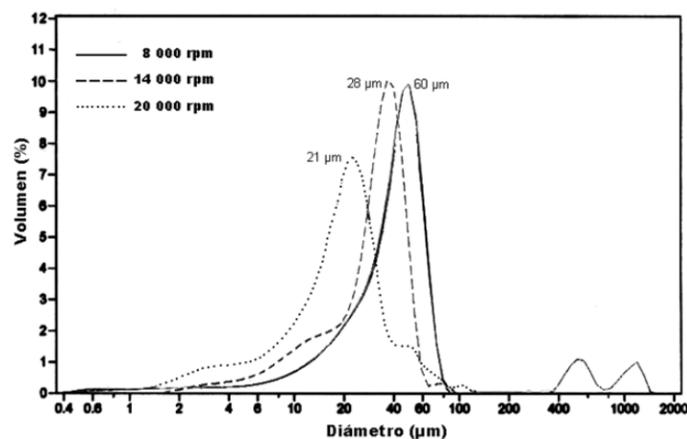


Figura 4.9. Efecto de la velocidad de agitación de la segunda emulsión sobre el tamaño de microesferas de PLGA cargadas con IFN- α 2b.

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó la velocidad de 14 000 rpm para la formación de la segunda emulsión durante el proceso de microencapsulación del IFN- α 2b y se prepararon cinco lotes experimentales de estas partículas con esta velocidad de agitación para formar la segunda emulsión. Al analizar las muestras se comprobó que el tamaño de las partículas fue similar (27,3, 27,3, 27,8, 28,1 y 29,7 μ m), lo que constituye una evidencia de la reproducibilidad de este parámetro en el procedimiento de encapsulación.

4.1.3 Efecto del modo de preparar la primera emulsión

Existen varias maneras de preparar una emulsión que, en esencia, consiste en dispersar la fase interna en la fase externa. Para la ruptura de la fase que se va a dispersar (fase interna) se utilizan fundamentalmente dos principios: *i*) mecánico, empleando un agitador común de laboratorio o equipos más complejos como dispersores que emplean dispositivos diversos dependiendo del propósito y el volumen de las soluciones con que se esté trabajando y *ii*) ultrasonido, usando equipos de ultrasonido de sonda o atomizadores ultrasónicos. El principio utilizado para fraccionar la fase a dispersar y el equipo empleado para ello pueden influir en la estructura interna de las partículas y esta, a su vez, puede repercutir indirectamente en otras propiedades tales como la carga, la eficiencia de encapsulación y el perfil de liberación de la molécula encapsulada.

En este trabajo se evaluó el efecto de la forma de obtener la primera emulsión sobre algunas características de las microesferas cargadas con IFN- α 2b y FCE. En las microesferas cargadas con IFN- α 2b la carga disminuyó de $1,2 \pm 0,2$ % a $0,6 \pm 0,2$ % ($p = 0,0004$) al sustituir el ultrasonido de sonda por el dispersor Ultraturax T8 para formar la primera emulsión. Sin embargo, se liberó mayor cantidad de la proteína al emplear este último (Figura 4.10). De forma similar, las microesferas que contienen FCE también experimentaron una disminución estadísticamente significativa ($p = 2,4 \times 10^{-8}$) en la carga al utilizar el dispersor ($0,34 \pm 0,04$ %) en vez de aplicar ultrasonido ($1,2 \pm 0,1$ %). La liberación de FCE fue muy pequeña en las partículas obtenidas aplicando ultrasonido para dispersar la solución acuosa de esta proteína en la solución polimérica: apenas se alcanzó el 10% de liberación en un período de 21 días. En cambio, se liberó aproximadamente 80% en este mismo período de tiempo cuando se formó la primera emulsión con el dispersor T8 (Figura 4.10).

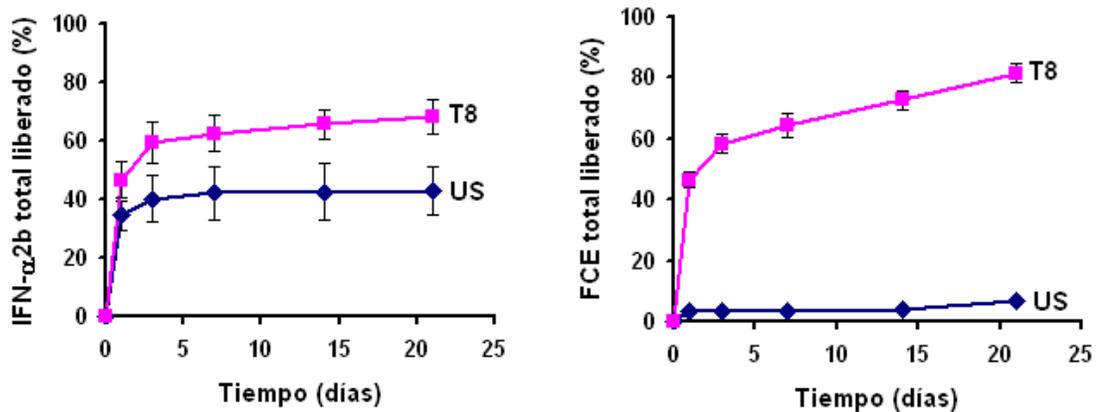


Figura 4.10. Efecto de la manera de formar la primera emulsión: US) mediante ultrasonido, T8) mediante un dispersor T8 en el perfil de liberación de IFN- α 2b (izquierda) y de FCE (derecha).

Resultados similares fueron reportados por Wischke y Borchert al encapsular albúmina de suero bovino con grupos de isotiocianato de fluoresceína acoplados (FITC-BSA, siglas en inglés) en microesferas de PLGA 50:50 (148). Estos autores encontraron menor eficiencia de encapsulación en las microesferas obtenidas al formar la primera emulsión con un dispersor Ultraturax T25 en lugar de aplicar ultrasonido, lo que se corresponde con una menor Q debido a que emplearon igual cantidad de proteína en ambos procesos de encapsulación. La liberación de FITC-BSA fue muy pequeña en las microesferas obtenidas con la aplicación de ultrasonido para formar la primera emulsión (<10%) con respecto a la alcanzada al incubar las microesferas preparadas con el Ultraturax T25, las cuales llegaron a liberar más del 90% de la proteína encapsulada.

En este trabajo, al formar la primera emulsión con IFN- α 2b y FCE se observó que aquellas que recibieron ultrasonido se formaron más rápidamente, tuvieron una opacidad mucho mayor y demoraba más tiempo en separarse nuevamente las fases. Los resultados obtenidos, conjuntamente con esta observación, pueden indicar que de esta forma se logra una mejor dispersión de una fase en la otra, lo que pudiera estar dado por la formación de gotículas más pequeñas de la solución de proteína en la solución polimérica. De este modo, es posible que se hayan obtenido estructuras internas de las microesferas más densas a lo cual se asocian cargas más elevadas y menor perfil de liberación. Wischke y Borchert comprobaron experimentalmente que las gotículas de la fase acuosa interna fueron mayores en la emulsión preparada con el Ultraturax T25 y que la proteína quedó localizada mayormente en la superficie de estas microesferas y relacionaron estos dos hallazgos con diferencias en la estructura interna de las microesferas obtenidas que repercutieron en las características finales de las mismas en cuanto a la eficiencia de encapsulación y el perfil de liberación (148).

De acuerdo con estos resultados es más conveniente la encapsulación del FCE utilizando el dispersor de tipo Ultraturrax para formar la primera emulsión. Sin embargo, no fue posible utilizar este dispositivo para los estudios posteriores en el caso del IFN- α 2b ya que las emulsiones formadas son más inestables y esto hace que la encapsulación y los resultados de esta (las microesferas) dependan de la rapidez y habilidad del operario en llevar a cabo las operaciones del proceso.

De manera general se observa que el aumento de la concentración de proteína y del volumen en la fase acuosa interna conlleva a un aumento en la carga de las microesferas pero provoca una disminución de la eficiencia de la encapsulación; sin embargo casi no producen variación en el tamaño de las partículas. En cambio esta última característica sí es afectada por la velocidad de agitación al formar la segunda emulsión. El modo de preparar la primera emulsión también es un factor importante en las características de las microesferas en cuanto a Q y perfil de liberación. La determinación de las relaciones matemáticas entre algunas condiciones experimentales (ej: la concentración de FCE y el volumen de la fase acuosa interna) y características de las microesferas como la carga y la eficiencia de encapsulación permite diseñar *a priori* el proceso de encapsulación en función de las características específicas deseadas.

4.2 Efecto de la naturaleza de los componentes del sistema en las características de las microesferas obtenidas

Las microesferas cargadas con una proteína dada pueden considerarse como un sistema compuesto por entidades químicas complejas como la matriz polimérica y la proteína, y otras menos complejas como diferentes aditivos que se introducen en las partículas con variados propósitos. En esta parte del trabajo se estudia el efecto de las propiedades más relevantes de cada uno de estos componentes sobre las principales características de las microesferas de PLGAs formadas con ellos.

4.2.1 El carácter hidrofóbico de la proteína encapsulada

Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel muy importante en los sistemas que incluyen a proteínas y a los polímeros derivados de los ácidos láctico y glicólico (151). Estas interacciones pueden afectar las propiedades de las proteínas (152), variar la eficiencia de encapsulación de la biomoléculas en las microesferas de PLGAs (153), e influir significativamente en el perfil de liberación obtenido (7).

En este trabajo se determinó cómo la diferencia en el carácter hidrofóbico del FCE y el IFN- α 2b influye en las características de las microesferas de PLGAs cargadas con estas proteínas. Como una medida de su hidrofobicidad se tomaron los tiempos de retención en RP-HPLC. Los tiempos de

retención en esta cromatografía líquida permiten una sencilla valoración del carácter hidrofóbico relativo entre varias proteínas (154).

Primero se analizaron, por RP-HPLC, una muestra de IFN- α 2b y otra de FCE de forma independiente y se identificaron los tiempos de retención para cada proteína ($t_{r\text{IFN-}\alpha 2b}$: 28,79 min, $t_{r\text{FCE}}$: 17,70 min y 15,97 min). Después se analizó, en las mismas condiciones, una mezcla de las dos proteínas y partir del cromatograma (Figura 4.11) puede inferirse que el IFN- α 2b es más hidrofóbico que el FCE. La preparación de FCE utilizada en esta investigación consta de dos especies, una de 51 aminoácidos y la otra de 52. Estudios anteriores (155) han demostrado que la señal (a) en la Figura 4.11 se corresponde con la especie de 51 aa y por tanto es la menos hidrofóbica de las dos. Otro aspecto considerado para asignar las señales del FCE a la especie de 51 ó 52 aa es la proporción que de las mismas hay en la mezcla, la cual se obtuvo del certificado de calidad del lote de proteína utilizado. En este caso particular el FCE contiene 8,85% de FCE de 51 aa y 88,55% de FCE de 52 aa. Esto se corresponde con que la señal de menor tiempo de retención es la menos intensa y es la asignada a la especie de 51 aa.

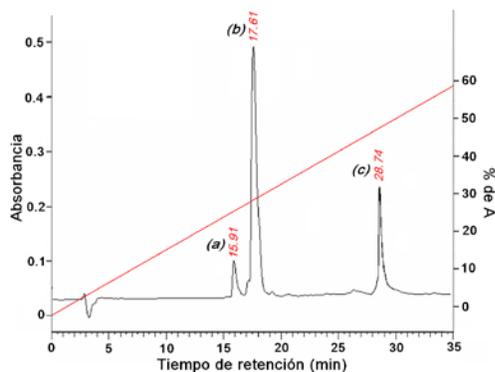


Figura 4.11. Cromatograma correspondiente a la separación de una mezcla de IFN- α 2b (señal c) y FCE (señal a: FCE de 51 aa; señal b: FCE de 52 aa) mediante RP-HPLC.

4.2.1.1 Diferencias en la carga y la eficiencia de encapsulación

Para determinar el efecto de la diferencia de hidrofobicidad entre el IFN- α 2b y el FCE en Q y EE se prepararon las microesferas por la variante 1 a partir de soluciones de tres concentraciones distintas de cada proteína (Tabla 4.2).

Ambos parámetros fueron sólo ligeramente superiores para las microesferas de IFN- α 2b. Otros autores han referido un aumento de Q y EE cuanto mayor es la hidrofobicidad de la proteína encapsulada. Esto se debe a que las atracciones hidrofóbicas entre las proteínas y los PLGAs hacen que durante el proceso

de encapsulación mayor fracción de biomoléculas se mantenga sin pasar a la fase acuosa externa de la doble emulsión

Tabla 4.2. Carga y eficiencia de encapsulación del IFN- α 2b y el FCE en microesferas de PLGA.

Concentración de Proteína (mg/mL)	Q (%)		EE (%)	
	IFN- α 2b	FCE	IFN- α 2b	FCE
5	0,41 \pm 0,04	0,35 \pm 0,02	80 \pm 10	70 \pm 30
10	0,65 \pm 0,04	0,56 \pm 0,09	59 \pm 4	60 \pm 10
20	1,2 \pm 0,2	0,96 \pm 0,09	56 \pm 8	50 \pm 10

4.2.1.2 Diferencias en el perfil de liberación

Las muestras a los distintos tiempos fueron tomadas de dos formas: 1) con recambio parcial del medio de liberación y 2) con recambio total. La liberación del IFN- α 2b fue siempre menor que la del FCE (Figura 4.12). Al final del estudio menos del 50 % del IFN- α 2b se liberó en cambio más del 95% del FCE pasó de las partículas al fluido receptor.

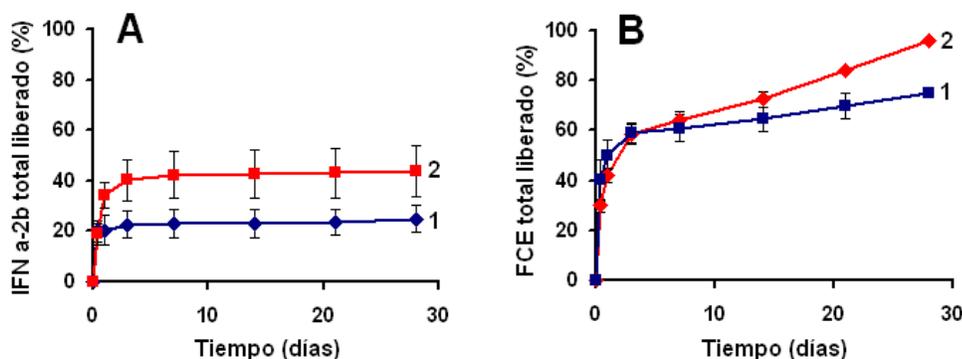


Figura 4.12. Perfiles de liberación de IFN- α 2b (A) y FCE (B) obtenidos de dos formas diferentes: 1) Con recambio parcial del medio receptor (10%), 2) Con recambio total del medio receptor.

En este estudio las microesferas de FCE se obtuvieron mediante la variante 2 puesto que el perfil de liberación de las microesferas elaboradas por la variante 1 (que difiere fundamentalmente en el empleo de ultrasonido para formar la primera emulsión) carece de interés práctico, mientras que las de IFN- α 2b se prepararon, como se especificó al principio del epígrafe, siguiendo la variante 1. Esta diferencia de procedimientos, fundamentalmente en cuanto a la forma de preparar la primera emulsión, repercute en el perfil de liberación como se ha mostrado antes (ver la Figura 4.10, página 57). Concretamente se

libera 20% más de IFN- α 2b llegando a liberarse el 60% del total encapsulado. No obstante, el patrón de liberación es el mismo (liberación inicial de una fracción elevada del total que se alcanza al final del estudio y liberación posterior muy pequeña) y se repite que la liberación es incompleta. Por estas razones se consideró que, a pesar de emplearse procedimientos diferentes para obtener las microesferas de IFN- α 2b y FCE, la diferencia entre los perfiles de liberación de ambas proteínas es notable y pudiera deberse fundamentalmente a las diferencias entre las moléculas.

Este resultado era esperado pues correlaciona con la mayor hidrofobicidad del IFN- α 2b. No obstante, como la diferencia en la cantidad de proteína liberada (45 ó 60% *versus* 95%) es notable, pudiera ser que otros factores influyan además en este fenómeno. Es probable que también la diferencia en las estructuras de las proteínas tenga un efecto importante. El FCE tiene menos de 53 aminoácidos (el IFN- α 2b tiene 165) y una estructura más rígida debido a sus tres puentes de disulfuro (155) mientras que el IFN- α 2b sólo tiene dos (156). Todo esto provoca que el factor de crecimiento sea mucho más pequeño que la citocina y los procesos de difusión pudieran ocurrir más fácilmente para el primero que para la segunda.

4.2.1.3 Factores que influyen en la liberación incompleta del IFN- α 2b

- Adsorción del IFN- α 2b a la matriz polimérica

Para corroborar la existencia de una atracción entre el IFN- α 2b y el PLGA se incubó a 37°C una solución de la proteína con microesferas y se determinó la variación de la concentración de esta en el tiempo (Figura 4.13).

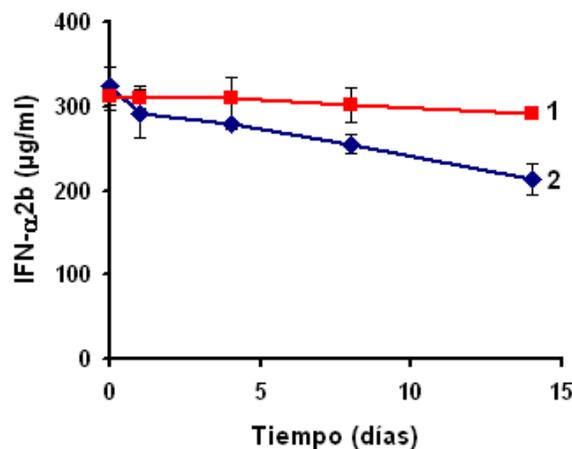


Figura 4.13. Comportamiento de la concentración de IFN- α 2b en solución incubada a 37°C durante 15 días sin microesferas (1) y en presencia de microesferas de PLGA (2).

Al incubar una solución de IFN- α 2b en presencia de microesferas de PLGA vacías se observó una disminución de la concentración de la proteína a partir de los 4 días, lo cual se comprobó al ajustar los datos a un modelo de regresión lineal que arrojó una pendiente negativa (-7,06 μ g/mL) estadísticamente significativa ($p = 0,0000$). Sin embargo, la misma solución incubada sin las microesferas mantuvo la concentración de interferón constante, puesto que la pendiente de la curva que mejor se ajustó a los datos experimentales no fue significativamente distinta de cero ($p = 0,0692$).

Este resultado demuestra que existe una atracción entre el IFN- α 2b y el PLGA aunque no ocurre tan marcadamente como en otras proteínas (126, 157). Por ejemplo, Jiang y cols. encontraron que más del 30% de la lisozima se adhería al PLGA en un experimento similar al descrito en este trabajo (157). En cambio, aquí menos del 20% del IFN- α 2b se unió al polímero. Esto puede deberse a que esta citocina tiene también un marcado carácter hidrofílico demostrado por su alta solubilidad en soluciones acuosas (> 50 mg en 1 mL de agua).

No obstante, se comprobó que la unión entre el IFN- α 2b y el PLGA se debía a interacciones hidrofóbicas. Se estudió la liberación de IFN- α 2b de las partículas en medio acuoso con y sin SDS. Este detergente aniónico ha sido ampliamente utilizado para apantallar las interacciones hidrofóbicas entre proteínas y polímeros (158). En el medio de incubación (PBS, Tween 80 al 0,001% y azida sódica al 0,1%) con SDS 5 mM adicionado, se encontró prácticamente toda la proteína encapsulada (92%) mientras que sin la presencia de SDS sólo se encontró el 45% del IFN- α 2b encapsulado (Figura 4.14). Esto demostró que las interacciones hidrofóbicas tienen un efecto importante en la atracción entre el IFN- α 2b y el PLGA.

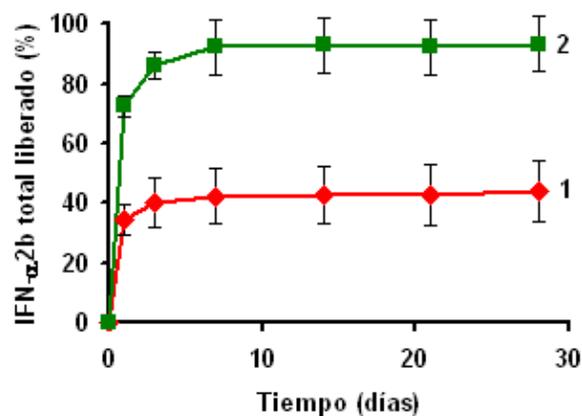


Figura 4.14. Perfil de liberación de IFN- α 2b contenido en microesferas de PLGA que fueron incubadas en fluido receptor sin SDS (1) y con SDS 5 mM (2).

También de la Figura 4.14 se puede inferir que las interacciones hidrofóbicas no son las únicas responsables de la liberación incompleta del IFN- α 2b. Aun en presencia de SDS, casi el 10% de la proteína queda atrapada dentro de las micropartículas. Otros dos factores que pueden influir son: *i*) la degradación insuficiente del polímero durante el período de evaluación (78) y *iii*) cambios en la molécula tales como la conversión de ésta en especies complejas parcial o completamente insolubles (motivados por su exposición a extensas interfases y a las fuerzas de cizalla que genera la agitación mecánica) que retardan o imposibilitan el paso de la proteína hacia el medio receptor (157).

- Degradación incompleta de la matriz polimérica durante el período de liberación in vitro

Al estudiar, mediante SEM, las características morfológicas de las microesferas de PLGA cargadas con IFN- α 2b antes y después del perfil de liberación, se observó que las mismas casi no cambiaron su apariencia durante 28 días de incubación en el medio receptor (Figura 4.15). Sólo se observó una ligera erosión en la superficie de las microesferas.

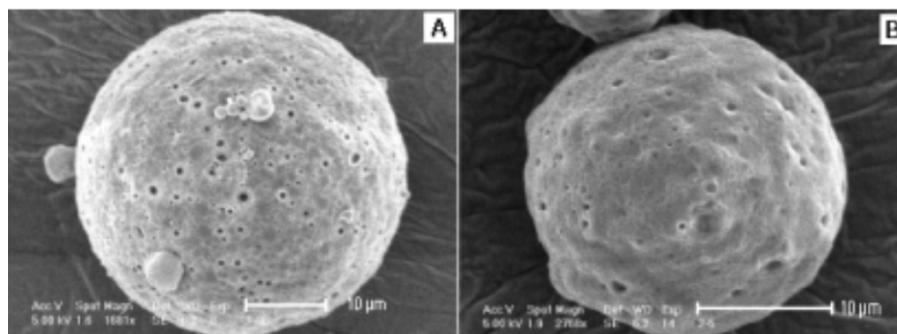


Figura 4.15. Micrografías de microesferas de PLGA cargadas con IFN- α 2b antes (A) y después (B) de 28 días de incubación en el medio receptor.

Por otra parte, el análisis de la matriz polimérica mediante cromatografía de permeación en gel arrojó que, aunque la masa molecular del polímero experimentó una disminución de 37 400 a 19 700 g.mol⁻¹, ésta parece ser aún elevada con respecto a la masa molecular crítica a partir de la cual comienza la erosión masiva de las partículas y por tanto el mecanismo de erosión interviene también en la liberación de la molécula encapsulada. No existe un valor único de masa crítica del polímero que constituya un umbral para el inicio de la erosión masiva de la matriz polimérica sino que se reportan valores desde 1 100 g.mol⁻¹ (159) hasta 15 000 g.mol⁻¹ (160) o 20 000 g.mol⁻¹ (161). Otros autores consideran que este fenómeno comienza a ocurrir cuando el polímero ha experimentado una degradación cercana al 90% (43). No obstante, esta estructura poco erosionada pudiera restringir la

difusión del IFN- α 2b a través de ella y ser una de las causas de la liberación incompleta de esta proteína.

Con el objetivo de conocer los fenómenos que intervienen en la liberación del IFN- α 2b y el FCE se realizaron ajustes a modelos teóricos de los perfiles de liberación de ambas proteínas. Para ello se obtuvieron perfiles de liberación con mayor cantidad de datos al inicio del período de incubación. En el Anexo 1 se muestran los resultados de los mismos y el análisis estadístico del ajuste de los datos experimentales a los modelos utilizados.

En muchos de los sistemas basados en microesferas de PLGAs la liberación de la sustancia encapsulada ocurre por la contribución de dos fenómenos fundamentales: 1) la difusión de la sustancia a través de la matriz polimérica y de los poros y canales de esta y 2) la erosión de las partículas provocada por la degradación de la matriz polimérica. Por esta razón se utiliza frecuentemente un modelo de cinética mixta desarrollado por Beren y Hopfenberg que tiene como expresión matemática (162):

$$C(\%) = k_1 \cdot t + k_2 \cdot t^{1/2} \quad (4.1)$$

donde $C(\%)$ es la fracción de la sustancia liberada en el tiempo t , que es la suma de dos términos: uno debido a la contribución de la erosión caracterizado por la constante k_1 y otro debido a la difusión de la sustancia caracterizado por la constante k_2 .

Los datos experimentales se ajustaron además a la ecuación semi-empírica de Korsmeyer-Peppas (163), que es un modelo muy utilizado en aquellos sistemas cuyo mecanismo de liberación no se conoce bien o cuando en la liberación de la sustancia activa se involucra más de un fenómeno (164). La ecuación del modelo puede expresarse como:

$$C(\%) = k_p \cdot t^n \quad (4.2)$$

donde $C(\%)$ es la cantidad de principio activo en el tiempo t , k_p es una constante que incorpora las características de la matriz polimérica y de la sustancia que difunde, y n es el exponente difusional que constituye un indicador del mecanismo de transporte.

Los resultados de ambos ajustes aparecen descritos en el Anexo 1. De forma general se obtuvo que los datos experimentales del perfil de liberación del IFN- α 2b se ajustan al modelo de la cinética mixta ($R^2 = 0,88$), mientras que este modelo no reproduce el comportamiento experimental de la liberación del FCE ($R^2 = 0,17$). Sin embargo, en ambos casos las constantes k_1 son negativas por lo que carecen

de sentido físico, por tanto, a partir de este tratamiento matemático no puede conocerse la magnitud de la contribución de la erosión y la difusión en la liberación del IFN- α 2b o el FCE contenido en estas microesferas.

Por su parte, el modelo de Korsmeyer-Peppas es apropiado para describir la liberación de ambas proteínas (R^2 (IFN- α 2b) = 0,91; R^2 (FCE) = 0,98). El análisis del criterio de información de Akaike también señala a este modelo como el más adecuado para describir el comportamiento de los datos experimentales de la liberación de IFN- α 2b y FCE (Anexo 1).

En la Figura 4.16 se muestra cómo el modelo de Korsmeyer-Peppas reproduce mejor que el de la cinética mixta el comportamiento experimental de los datos del perfil de liberación del FCE.

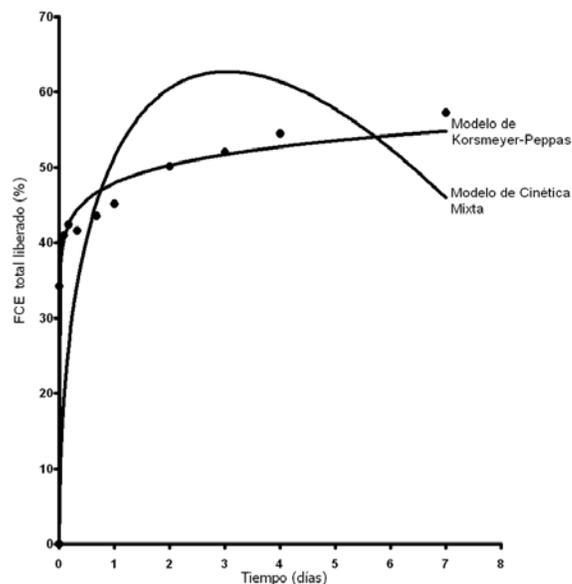


Figura 4.16. Ajuste de los datos experimentales (●) de la liberación de FCE con recambio parcial del medio a distintos modelos teóricos.

Ritger y Peppas, en un trabajo posterior publicado 1987, desarrollaron este modelo para sistemas cilíndricos y esféricos. Estos autores encontraron los valores de n que constituyen los límites para considerar que la liberación de la sustancia encapsulada ocurre por un mecanismo u otro. Específicamente, obtuvieron que el exponente n tiene un valor de 0,43 para dispositivos esféricos cuando la liberación ocurre por una difusión de tipo Fick (165). También investigaron el efecto de la dispersión del tamaño de las partículas y el ancho de la misma en el valor del exponente n y encontraron que este puede ser menor en muestras polidispersas y con una distribución ancha del tamaño de las partículas (165). Estos y otros autores han considerado que la liberación de un principio

activo contenido en un dispositivo esférico ocurre principalmente por difusión cuando el exponente n es menor que 0,43 (166-168) y en la medida que se incrementa por encima de este valor comienzan a tener importancia otros fenómenos tales como la relajación de las cadenas poliméricas debida a la entrada de agua en el dispositivo (168, 169).

En nuestro estudio, los valores obtenidos para n fueron menores que 0,43 (0,18 para el caso del IFN- α 2b y 0,07 para el FCE), por lo que se descarta la presencia de un mecanismo de difusión anómalo o de orden cero. Pudiera considerarse que la difusión está presente en la liberación de IFN- α 2b y FCE de las matrices de PLGA; sin embargo existen otros elementos que contribuyen a que los valores de n se alejen de los predichos por Ritger y Peppas (165). En epígrafes anteriores se ha mostrado que las distribuciones de tamaño de las microsferas de IFN- α 2b y FCE son relativamente anchas y, en ocasiones se encuentran poblaciones de partículas de otros tamaños (ver los epígrafes 4.1.1.2 y 4.1.2). Por otra parte, se ha demostrado que existen interacciones hidrofóbicas entre las proteínas encapsuladas y las matrices las cuales influyen negativamente en la liberación de las biomoléculas. Estos dos hechos pudieran haber incidido en los valores bajos de n calculados al ajustar los datos experimentales de la liberación de estas dos proteínas al modelo semiempírico de Korsmeyer-Peppas.

Del análisis conjunto de los resultados obtenidos a partir del estudio morfológico de las partículas antes y después del período de liberación y del ajuste de los perfiles de liberación a estos dos modelos se puede decir, que la liberación del IFN- α 2b y el FCE encapsulados en las matrices empleadas en este trabajo ocurre principalmente por procesos difusionales fuertemente modificados por características del sistema tales como la amplitud de las distribuciones de tamaños de las partículas y la presencia de interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y la matriz polimérica.

- Formación de agregados de IFN- α 2b durante la obtención de la primera emulsión

La formación de una extensa interfase durante la dispersión de la solución acuosa de proteína en la solución polimérica ha sido identificada como una de las mayores causas de la formación de agregados en los procesos de microencapsulación por la técnica de doble emulsión - evaporación del disolvente (57). Simular la formación de la primera emulsión sin la presencia del polímero ha sido uno de los métodos empleados para predecir la estabilidad de una proteína dada frente a esta etapa de la encapsulación (115, 170).

Al dispersar una solución acuosa de IFN- α 2b en DCM se observó que aproximadamente el 30% de la proteína se localizó en la interfase independientemente del tiempo en que recibió ultrasonido (30 ó 60 s), mientras que el resto se recuperó en las fases acuosas de las dos extracciones (Figura 4.17).

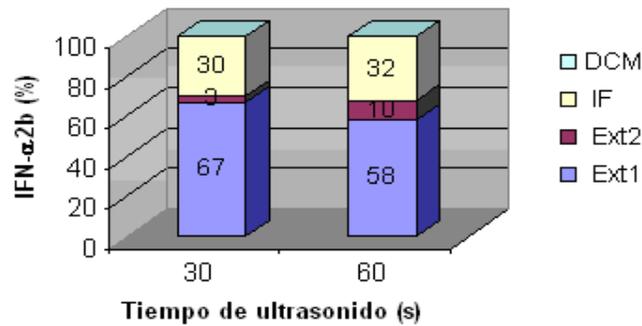


Figura 4.17. Distribución del IFN- α 2b en las fases luego de la extracción (DCM: diclorometano, IF: interfase, Ext1: Fase acuosa recuperada después de la primera extracción, Ext2: Fase acuosa recuperada después de la segunda extracción).

Cada una de las muestras fue analizada mediante SDS-PAGE y se observó la presencia de una mayor proporción de las señales correspondientes a especies agregadas de IFN- α 2b (dímeros y trímeros) en las muestras de las interfases (Figura 4.18).

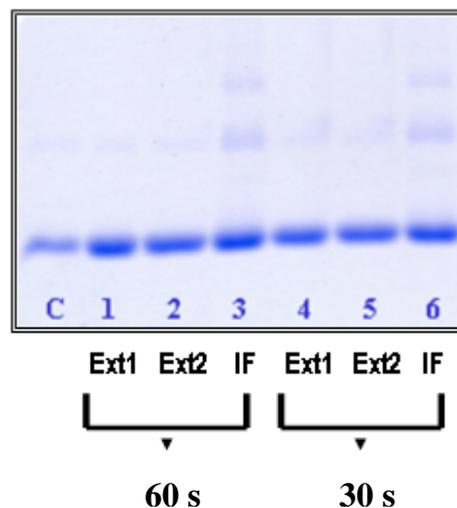


Figura 4.18. Electroforesis en gel de poliacrilamida (en condiciones no reductoras) del IFN- α 2b presente en las diferentes fases de la extracción realizada a la emulsión de las soluciones de proteína y polímero durante 30 ó 60 s.

El reconocimiento inmunoenzimático por los anticuerpos de un sistema ELISA del IFN- α 2b presente en estas muestras también fue evaluado y se detectó una disminución del mismo en la proteína recuperada de las interfases (Tabla 4.3). Este resultado indica que la proteína sufre cambios en sus propiedades físico-químicas y biológicas cuando se adhiere a la interfase que se genera durante la formación de la emulsión. Algunos autores han encontrado este mismo efecto en mayor o menor grado. Por ejemplo Cleland y Jones reportaron que la hormona de crecimiento humana experimentaba la

formación de agregados en una gran extensión luego dispersar una solución de la proteína a 10 mg/mL con DCM (sólo el 53% quedaba en forma no agregada) (115) y mientras que Kang y cols. lograron recuperar el 83% de la proteína en forma soluble y con un elevado grado de conservación de su actividad específica (93%) (170).

Tabla 4.3. Reconocimiento inmunoenzimático del IFN- α 2b presente en la mezcla de las fases acuosas y en la interfase de la extracción de muestras tratadas con ultrasonido durante 30 ó 60 s.

Fase	Reconocimiento inmunoenzimático (%)	
	30 s	1 min
Extracción	100	100
Interfase	71	72

Los valores representan el porcentaje de la proteína cuantificada mediante el ELISA con respecto a la masa determinada por el ensayo de microBCA.

Los cambios que sufre el IFN- α 2b durante la formación de la primera emulsión también pudieran influir en la liberación incompleta de la misma.

Se puede concluir entonces, de esta parte del trabajo, que la diferencia entre los perfiles de liberación del FCE y el IFN- α 2b se debe fundamentalmente a los distintos grados de hidrofobicidad de estas proteínas. No obstante, en la liberación incompleta del IFN- α 2b influye también la formación de agregados durante la obtención de la primera emulsión.

4.2.1.4 Efecto de variar la hidrofobicidad del FCE y el IFN- α 2b sobre las propiedades de las microesferas

- FCE

La preparación de FCE utilizada en este trabajo esta constituida por dos especies: una de 51 y otra 52 aa. La de menor tamaño es menos hidrofóbica como se puede deducir de la separación por RP-HPLC (Figura 4.11). Para obtener las microesferas se utilizaron tres soluciones de FCE con distintas proporciones de las especies de 51 y 52 aa (Tabla 4.4) las cuales tienen distinta hidrofobicidad total. A medida que aumentó la proporción de la especie más hidrofóbica aumentaron la carga y la eficiencia de encapsulación, mientras que disminuyó la cantidad inicial de FCE liberada durante el primer día.

Los resultados complementarios de un análisis de varianza y la prueba de Duncan mostraron que hay diferencia significativa entre la carga de las tres muestras evaluadas ($p = 0,0046$), así como en la eficiencia de encapsulación ($p = 0,0021$) y en la cantidad de FCE liberado el primer día ($p = 0,0000$), para un nivel de confianza de 95%.

Tabla 4.4. Carga, eficiencia de encapsulación y liberación inicial de las microesferas obtenidas a partir de soluciones de FCE con diferente proporción de las especies de 51 y 52 aa, que tienen diferente superficie hidrofóbica.

Composición del FCE encapsulado		Q (%)	EE (%)	FCE liberado durante el primer día (%)	Superficie hidrofóbica total (Å ²)
51 aa (%)	52 aa (%)				
70,94	25,28	0,24 ± 0,01	13 ± 1	41 ± 1	672,3
64,78	31,57	0,31 ± 0,02	19 ± 1	32 ± 1	674,3
33,47	62,56	0,41 ± 0,02	27 ± 1	26 ± 1	678,6

La liberación inicial que se produce cuando las microesferas se sumergen en un medio acuoso está relacionada fundamentalmente con la fracción de proteína ubicada en la superficie de las partículas y en las cercanías de los poros y canales de esta. Mientras mayor es el carácter hidrofílico de una proteína mayor es la capacidad de la misma de migrar hacia la fase acuosa externa durante la formación de las partículas lo que favorece su ubicación preferencial en la superficie de las partículas y, consecuentemente, aumenta la cantidad de proteína liberada inicialmente. Estos resultados, conjuntamente con la variación experimentada por la carga y la eficiencia de encapsulación, apoyan la hipótesis de que en el proceso de encapsulación de las proteínas en matrices de PLGAs las interacciones hidrofóbicas tienen un efecto importante.

Mediante las herramientas computacionales que existen para la modelación y el análisis de estructura de proteínas se calculó la superficie hidrofóbica de las dos especies de FCE teniendo en cuenta los 10 modelos construidos para cada estructura (ver el anexo 2). Estos parámetros fueron denominados SH_{51} y SH_{52} para las moléculas de 51 y 52 aa respectivamente. Para hallar la superficie hidrofóbica total (SH_t) presente en cada una de las soluciones de FCE empleadas para encapsular (ecuación 4.6), se sumaron las contribuciones de cada especie teniendo en cuenta la proporción de ellas en la mezcla (r_{51} y r_{52}).

$$SH_t = r_{51} \cdot SH_{51} + r_{52} \cdot SH_{52} \quad (4.6)$$

Se investigó si existía relación entre los valores calculados de superficie hidrofóbica total (Tabla 4.4) disponible en las soluciones de FCE encapsuladas y los parámetros evaluados en las microesferas. Se encontró una relación lineal directa de esta variable con la carga (Figura 4.19A) y la eficiencia de encapsulación (Figura 4.19B) e inversa con el FCE liberado durante el primer día (Figura 4.19C).

Estos resultados demuestran la importancia de las interacciones hidrofóbicas en el proceso de encapsulación de proteínas en microesferas de PLGAs pues se obtuvieron diferencias significativas en las características de las partículas preparadas con sólo variar las proporciones de las dos especies

presentes. Ambas especies tienen diferencias estructurales mínimas pues la especie de 51 aa sólo tiene un aminoácido menos en el extremo C-terminal que la de 52 aa. Sin embargo, la presencia de la leucina en el extremo de la molécula representa un aumento de la superficie hidrofóbica de la especie de 52 aa lo que repercute luego en la carga, la eficiencia de encapsulación y la liberación inicial de FCE en las partículas.

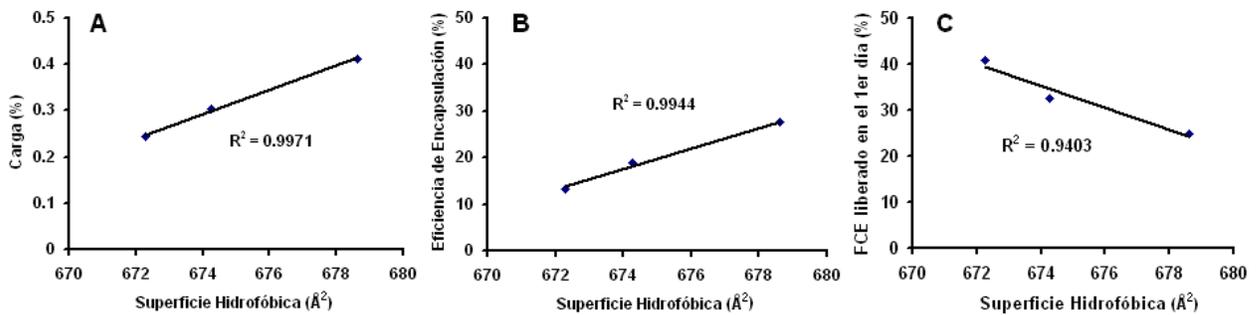


Figura 4.19. Relación lineal de la superficie hidrofóbica total presente en las mezclas de FCE de 51 y 52 aa utilizadas para microencapsular con la carga de las microsferas (A), la eficiencia de encapsulación (B) y el FCE liberado durante el primer día (C).

Es oportuno destacar que la superficie hidrofóbica adicional de la especie de 52 aa es prominente (Figura 4.20), lo que probablemente le confiere a esta región mayor importancia en las interacciones con la matriz polimérica.

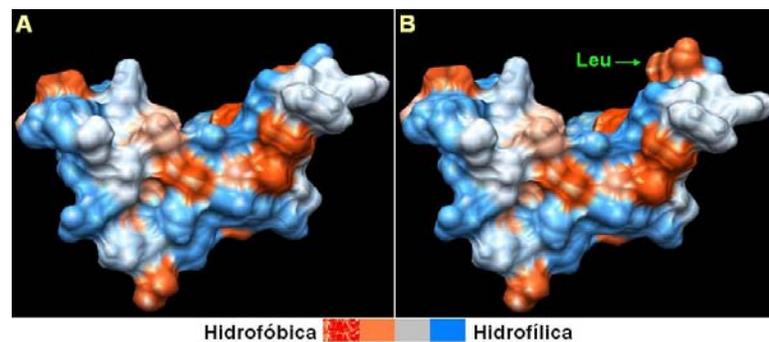


Figura 4.20. Modelos de las características superficiales de las especies de 51 (A) y 52 aa (B) del FCE. El aminoácido del extremo de la molécula de 52 aa es la leucina el cual que aporta una superficie hidrofóbica prominente a esta molécula.

- *IFN-α2b*

Se encapsularon especies menos hidrofóbicas que el IFN-α2b debido a que estaban conjugadas a PEG. La conjugación a PEG causa una disminución significativa de la hidrofobicidad de las proteínas por el

impedimento estérico sobre los dominios hidrofóbicos de las mismas. Esta disminución es mayor en la medida que aumenta el tamaño del PEG conjugado y el número de cadenas del polímero que se unen a la proteína (171).

Se utilizaron tres conjugados diferentes: 1) IFN- α 2b conjugado a una molécula de PEG lineal de 12×10^3 g.mol⁻¹ (IFN- α 2b-PEG₁₂), 2) IFN- α 2b conjugado a una molécula de PEG lineal con dos ramas de 12×10^3 g.mol⁻¹ cada una (IFN- α 2b-2PEG₁₂) y 3) IFN- α 2b conjugado a una molécula ramificada de PEG de 40×10^3 g.mol⁻¹ (IFN- α 2b-PEG₄₀).

Se prepararon microesferas de PLGA por separado con los tres conjugados anteriormente mencionados y el interferón sin conjugar, y se determinó la carga de cada muestra obtenida (Tabla 4.5). Como hipótesis se planteó que, a medida que aumentaba la masa total de PEG conjugada disminuiría la carga de IFN- α 2b debido a la disminución de la hidrofobicidad, a la vez que aumentaría la liberación de la proteína. Esta hipótesis fue corroborada para las especies IFN- α 2b-2PEG₁₂ y IFN- α 2b-PEG₄₀. En cambio, con la especie IFN- α 2b-PEG₁₂ se obtuvieron microesferas con una carga superior a las obtenidas con el IFN- α 2b sin modificar. Este resultado inesperado puede explicarse por el aumento de la solubilidad en solventes orgánicos que provoca la conjugación a PEG en las proteínas (172). El proceso de encapsulación es sumamente complejo y muchos factores pueden incidir en esos resultados. Un aumento de la solubilidad de la proteína en solventes orgánicos pudiera favorecer la encapsulación por permitir la absorción de la proteína en la fase orgánica y evitar el paso de esta a la fase acuosa externa de la doble emulsión. Este último efecto pudiera haber prevalecido sobre la disminución de la hidrofobicidad en el caso del conjugado con una sola cadena de PEG lineal de 12×10^3 g.mol⁻¹. En cambio, los resultados indican que con los otros dos conjugados si predominó el efecto de la disminución de la hidrofobicidad.

Tabla 4.5. Carga de las microesferas de PLGA obtenidas con el IFN- α 2b nativo y 3 especies conjugadas a diferentes moléculas de PEG.

Proteína encapsulada	Q (%)
IFN- α 2b	0,45 ± 0,01
IFN- α 2b-PEG ₁₂	0,59 ± 0,06
IFN- α 2b-2PEG ₁₂	0,23 ± 0,04
IFN- α 2b-PEG ₄₀	0,06 ± 0,01

En cuanto a los perfiles de liberación (Figura 4.21), el IFN- α 2b nativo se liberó menos que todos los conjugados con PEG lo cual se corresponde con su mayor carácter hidrofóbico. Estas interacciones con el PLGA pueden retardar liberación de la molécula, e incluso impedir su liberación completa.

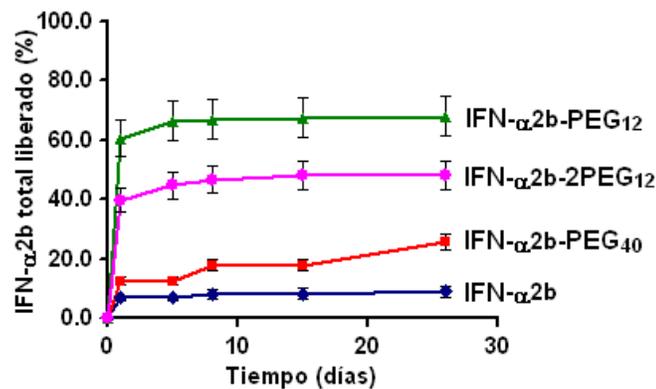


Figura 4.21. Perfil de liberación de IFN- α 2b nativo y 3 especies conjugadas a diferentes moléculas de PEG encapsulados en microesferas de PLGA mediante la técnica de doble emulsión - evaporación del disolvente.

La liberación de las especies PEGiladas no coincide con las hidrofobicidades estimadas de estas según la masa de PEG conjugada. Por el contrario, la relación es totalmente inversa. Esta aparente contradicción pudiera ser explicada por el gran volumen hidrodinámico del PEG. Uno de los efectos más drásticos de la PEGilación en las proteínas es el aumento significativo del volumen hidrodinámico y este depende positivamente de la masa de PEG conjugada (173). Además, en las condiciones de este trabajo la liberación ocurre fundamentalmente por difusión y no por la erosión de las microesferas (ver el epígrafe 4.1.1.5). Los resultados precisamente coinciden con una mayor liberación de las especies PEGiladas de menor volumen hidrodinámico, lo cual ha sido encontrado también por otros investigadores (128). La importancia de las interacciones hidrofóbicas en el perfil de liberación de las proteínas encapsuladas es demostrada por la mayor liberación de la especie IFN- α 2b-PEG₄₀ que el IFN- α 2b nativo a pesar de que este conjugado tiene un volumen hidrodinámico casi 5 veces mayor al compararlo por SDS-PAGE (14) y de que el gradiente de concentración que se establece entre el interior de las partículas y el medio receptor es mayor para el interferón nativo puesto que las microesferas obtenidas con él tienen una carga mayor.

Es oportuno explicar que la diferencia que existe entre el perfil de liberación del IFN- α 2b nativo liberado en este estudio y los perfiles de liberación mostrados anteriormente (ver las Figuras 4.10 y 4.12 en las páginas 57 y 61, respectivamente) se debe a que estas microesferas tuvieron una carga

menor puesto que se partió de soluciones de la proteína menos concentradas y, además, el perfil de liberación se hizo con recambio parcial del fluido receptor. La combinación de estos dos factores unido a que el mecanismo de liberación de la proteína ocurre por difusión trae como consecuencia una disminución de la liberación alcanzada.

Como conclusión parcial de estos estudios puede decirse que el grado de hidrofobicidad de las proteínas tiene un efecto importante sobre la encapsulación en microesferas de PLGAs y en su posterior liberación. Este efecto es perceptible a pesar de la multitud de factores que inciden en ambos procesos.

4.2.2 Las propiedades de la matriz de encapsulación

La matriz de encapsulación es otro de los elementos que mayor efecto ejerce en las propiedades del sistema final que se obtiene. Su naturaleza, la masa molecular, su carácter hidrofóbico, los grupos funcionales distribuidos en su estructura y en los extremos de la cadena, la movilidad de su estructura, la temperatura de fusión y/o de transición vítrea, son algunas de sus características que más fuertemente pueden incidir en las propiedades de las microesferas que se preparen con ellas (102, 174).

4.2.2.1 *Influencia de la proporción de ácido láctico en el polímero*

Para analizar el efecto de variar la cantidad de ácido láctico en el polímero se prepararon microesferas de IFN- α 2b y FCE con distintos polímeros y se les determinó el perfil de liberación (Figura 4.22).

En los dos casos, en la medida que el porcentaje de lactida aumentó de 50 a 100%, la liberación también aumentó. Consideramos que el efecto se debió fundamentalmente a este parámetro y no a la variación de la masa molecular del polímero. Para ambas proteínas, en este experimento, el comportamiento de la liberación respecto a la masa molecular del polímero fue contrario al observado en experimentos posteriores con igual proporción monomérica y grupo terminal del polímero.

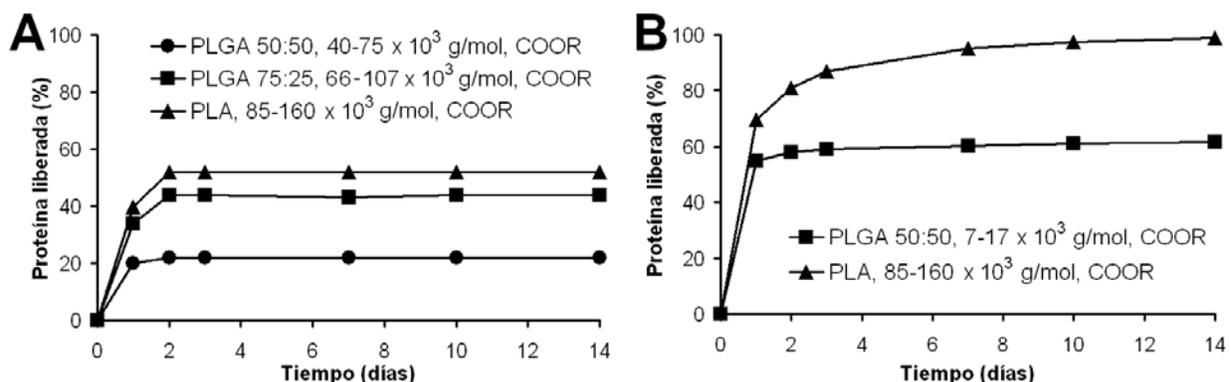


Figura 4.22. Perfiles de liberación de IFN- α 2b (A) y FCE (B) de microesferas de polímeros con distintas proporciones de los ácidos láctico y glicólico. El tipo de polímero se describe en cada figura.

Algunos autores han observado una dependencia inversa entre el porcentaje de ácido láctico y la liberación (175, 176). Esta relación ha sido explicada por el hecho de que al aumentar la cantidad del monómero glicolida el copolímero se hidroliza más rápidamente y el aumento que ocurre en la velocidad de erosión facilita la liberación de la sustancia encapsulada. Sin embargo, en otros trabajos se ha reportado un efecto similar al encontrado por nosotros (65, 177), es decir, un aumento de la liberación con el incremento de lactida en el polímero. Kim y Park en 2004 encontraron que liberación de la hormona de crecimiento humana fue mayor en microesferas de PLA que en aquellas fabricadas con PLGA 50:50 y que la liberación de esta proteína fue intermedia al ser encapsulada en una blanda de iguales masas de los dos polímeros (65). Estos autores demostraron la mayor cristalinidad de la matriz de PLA mediante los análisis por DSC y DRX de ambas matrices, y consideraron que esta propiedad del PLA les permitió obtener microesferas con una morfología interna reticulada y nanoestructurada. La degradación de la matriz nanoestructurada fue más lenta a la vez que facilitó la difusión de la molécula encapsulada por la menor interacción de esta con la matriz. La disminución de la velocidad de hidrólisis retardó a su vez los efectos adversos que ocasiona la misma sobre la proteína tales como la inducción de agregación o adsorción, que son causa de la liberación incompleta de las proteínas (65, 158). Por otra parte, Izumikawa y cols. (1991) estudiaron la cristalinidad de microesferas de PLA cargadas con progesterona y encontraron una liberación más rápida de la hormona en la medida que la cristalinidad de las matrices aumentó. Estos investigadores relacionaron este hecho, entre otros factores, con la disminución de las interacciones entre la sustancia encapsulada y la matriz en la medida que aumentó la cristalinidad del sistema (177).

Estas y otras investigaciones acerca de la degradación de las matrices derivadas de ácido láctico y glicólico han demostrado que: *i*) existe mayor cristalinidad de las matrices que tienen mayor porcentaje de PLA (65, 102), *ii*) aumenta la probabilidad de que haya dominios de fase separados del monómero lactida cuando hay mayor porcentaje de este en la matriz de PLGA (178) y *iii*) ocurre un aumento de la cristalinidad desde los inicios del período de incubación debida a la cristalización de los oligómeros de L-PLA, D-PLA y DL-PLA (44, 102) que resultan de la degradación de la matriz polimérica, pues la escisión de las cadenas por los enlaces que involucran a los residuos de ácido glicólico ocurre más fácilmente (44).

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente mencionados y que la difusión es el mecanismo fundamental de la liberación de las proteínas encapsuladas en este trabajo, se pudiera considerar que el aumento de la liberación de ambas proteínas al aumentar la proporción de lactida se debió fundamentalmente a la disminución de las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y la matriz por

la falta de movilidad de las cadenas de esta última en la medida que aumentó la cristalinidad del sistema.

4.2.2.2 Efecto de la masa molecular del polímero

Varios autores han investigado el efecto de la masa molecular del polímero en la velocidad de liberación de compuestos terapéuticos y casi todos coinciden en que se puede esperar que un aumento de este parámetro ocasiona una disminución de la velocidad de liberación de la molécula encapsulada (178). Nuestros resultados coinciden plenamente con esto (Figura 4.23).

La liberación de IFN- α 2b fue mayor al utilizar un PLGA de menor masa molecular (Figura 4.23A) y, a su vez, con este último (PLGA 50:50, 5-15 g.mol⁻¹) se obtuvo una liberación aún mayor del FCE. Este hecho está relacionado con que ambas proteínas se liberan por difusión y el FCE, al tener menor talla, difunde más fácilmente que el IFN- α 2b.

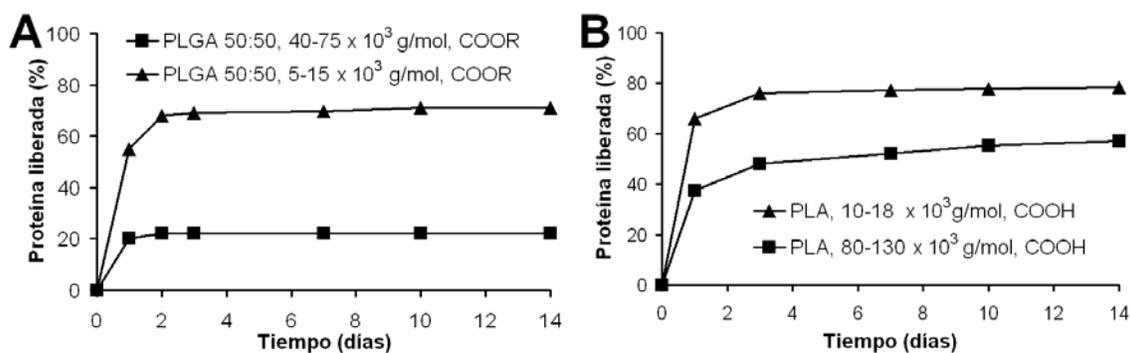


Figura 4.23. Perfiles de liberación de IFN- α 2b (A) y FCE (B) de microesferas de polímeros de distinta masa molecular. La masa molecular de los polímeros utilizados especifica en cada figura.

4.2.2.3 Efecto del grupo final

Para analizar la variación del perfil de liberación de la molécula encapsulada según al grupo final de la cadena polimérica (carboxilo o éster), se prepararon microesferas de IFN- α 2b y FCE con distintos polímeros. Los perfiles de liberación de estas aparecen en la Figura 4.24.

En todos los casos, la presencia de un grupo ácido al final de la cadena polimérica favoreció una mayor liberación de ambas proteínas. Aun cuando el efecto pudo ser solapado en el caso del IFN- α 2b en PLGA 50:50 (Figura 4.24A) por la mayor masa del polímero con grupo éster al final, para las microesferas de FCE las masas moleculares de los polímeros utilizados son iguales (Figura 4.24B).

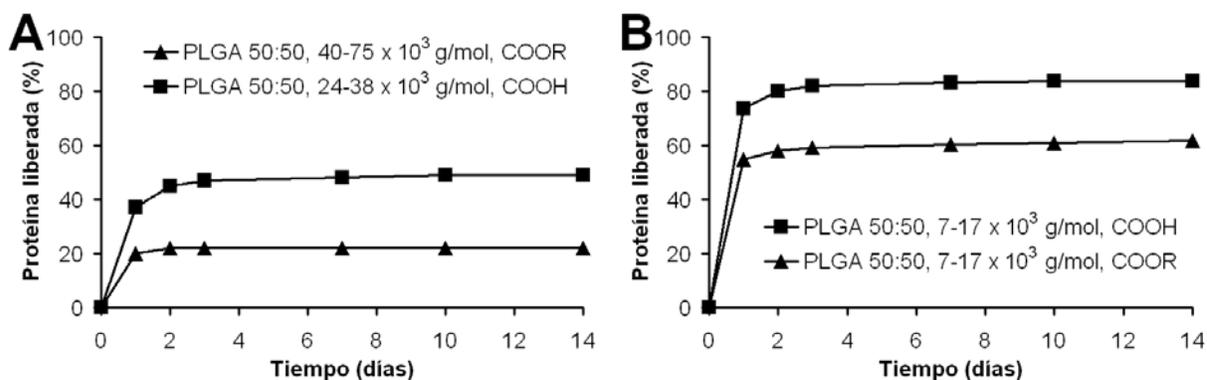


Figura 4.24. Perfiles de liberación de IFN- α 2b (A) y FCE (B) de microesferas de polímeros con distinto grupo terminal. El tipo de grupo terminal se describe en cada figura.

Muchos autores han encontrado que la presencia del grupo ácido favorece la liberación porque éste facilita la entrada de agua a la partícula y acelera la degradación (179). Aunque hay otros que han encontrado un efecto inverso y lo atribuyen a interacciones iónicas entre la proteína y el grupo carboxílico ionizado (180). En este trabajo se ha demostrado anteriormente que la erosión tuvo poca importancia en la liberación, por lo que se considera que la mayor liberación se debe al mayor carácter hidrofílico de los polímeros terminados en el grupo -COOH. Al tener las matrices mayor carácter hidrofílico disminuyen las interacciones hidrofóbicas polímero-proteína y aumenta la liberación de la molécula encapsulada.

4.2.3 Efectos de los aditivos co-encapsulados con la proteína

La adición de aditivos ha sido un método muy empleado en la estabilización de las proteínas durante el proceso de encapsulación en micropartículas de PLGAs y para mejorar los perfiles de liberación (117). Los resultados de estos estudios también pueden dar una idea de las interacciones que afectan la liberación de la proteína (123).

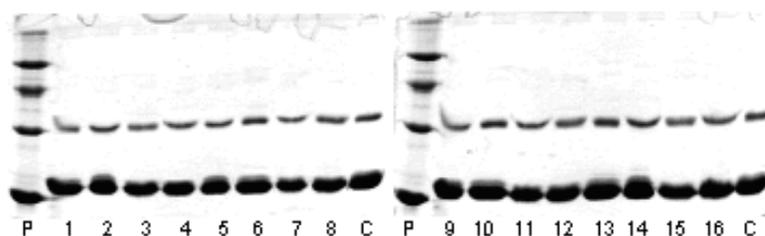
En este trabajo se estudió el efecto de 8 aditivos de diferente naturaleza sobre el perfil de liberación de IFN α -2b: Pluronic F-68, Pluronic F-127, Tween 20, Tween 80, manitol, trehalosa, lisina y EDTA. Para estudiar también los efectos combinados de estos aditivos se realizó un diseño factorial fraccionario 2^{8-4} con resolución IV, lo que permitió estimar los efectos independientes sin confusión con las interacciones de segundo orden (Tabla 3.2 de Materiales y Métodos, epígrafe 3.5.3.).

Primero se estudió la compatibilidad de la proteína con estas sustancias mediante el análisis de las mezclas preparadas por ELISA y SDS-PAGE (Tabla 4.6 y Figura 4.25).

Tabla 4.6. Concentración del IFN- α 2b mediante el ELISA en las fases acuosas internas empleadas para preparar las microesferas.

Muestra	IFN- α 2b (mg/mL)						
1	10,9	5	11,4	9	14,0	13	9,9
2	12,5	6	9,5	10	9,9	14	15,0
3	12,2	7	11,8	11	11,2	15	14,4
4	11,6	8	12,4	12	16,5	16	12,0

En todos los casos la proteína mostró un comportamiento similar a la muestra de referencia (muestra 1: IFN- α 2b sin aditivos) frente al reconocimiento por los anticuerpos monoclonales anti-IFN α -2b (Tabla 4.6) y no se incrementó la intensidad de las señales correspondientes al dímero en las muestras con respecto a la del control (solución de IFN- α 2b) (Figura 4.25).

**Figura 4.25.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fases acuosas internas (IFN- α 2b + combinación de aditivos según el plan experimental). P: Patrón de masa molecular, C: Solución de IFN- α 2b.

De acuerdo con estos resultados es posible decir que las diferentes combinaciones de aditivos, empleadas para obtener las microesferas correspondientes al plan experimental del diseño, no afectan las características físico-químicas del interferón que pueden ser evaluadas mediante ELISA y SDS-PAGE.

La liberación de IFN- α 2b a partir de las microesferas obtenidas con todas las combinaciones de aditivos aparece en la Figura 4.26. Todos los perfiles de liberación tuvieron una forma parecida pero con diferencias notables en la liberación durante el primer día que varió entre el 6 y el 38 % de la proteína encapsulada.

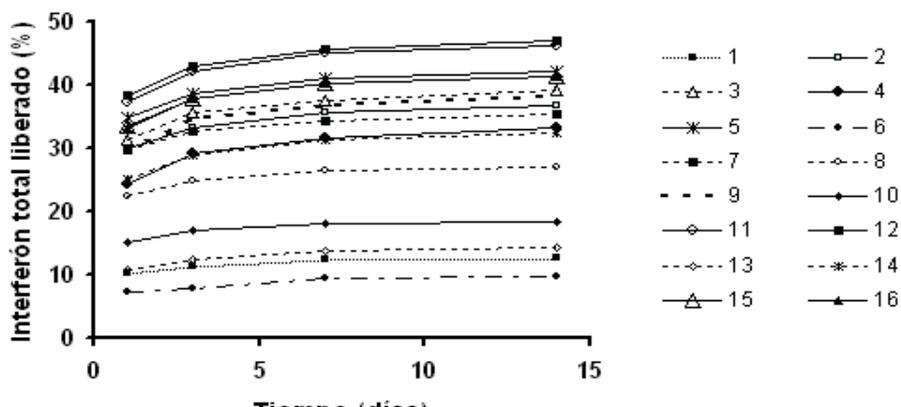


Figura 4.26. Perfil de liberación de IFN- α 2b de las microesferas elaboradas con diferentes aditivos en la fase acuosa interna (ver la composición de cada una en la Tabla 3.2, pág. 40).

En la liberación inicial de la proteína, el Pluronic F68, el Pluronic F127 y el Tween 20 los tuvieron una influencia significativa y positiva (Figura 4.27). Para ampliar el análisis del efecto de estos, se evaluó también la liberación ocurrida entre los días 1 y 14, es decir luego de la liberación inicial (Tabla 4.7).

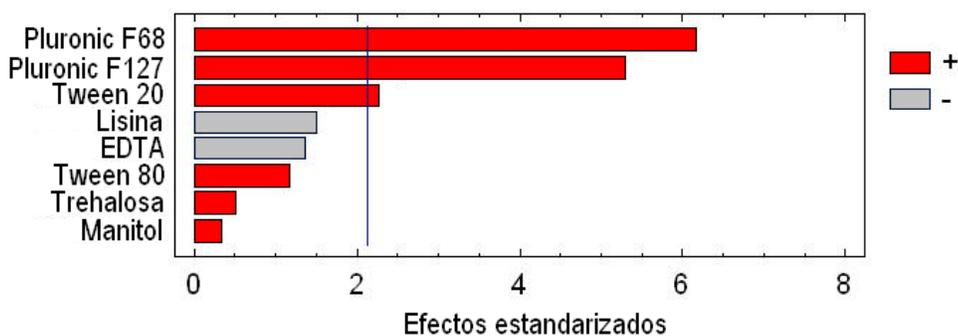


Figura 4.27. Representación de Pareto estandarizada para la liberación de IFN- α 2b en el primer día. La línea en azul indica el umbral de significación.

Tabla 4.7. Porcentaje de IFN- α 2b liberado entre 1 y 14 días.

Muestra	IFN- α 2b liberado (%)	Muestra	IFN- α 2b liberado (%)
1	2,5	9	8,7
2	6,8	10	3,5
3	7,9	11	9,0
4	8,7	12	8,5
5	7,4	13	3,7
6	2,5	14	7,4
7	5,6	15	8,0
8	4,6	16	8,3

El análisis de varianza mostró que los aditivos Pluronic F-127, Pluronic F-68, Tween 20 y EDTA ejercen un efecto estadísticamente significativo en la respuesta ya que el valor de la probabilidad fue menor que 0,05.

La representación de Pareto para los efectos estandarizados (Figura 4.28) no sólo muestra la significación de los efectos sino el sentido en que afectan a la variable respuesta. Los Pluronicos F-68 y F-127, así como el Tween 20 fueron los aditivos que tuvieron un efecto positivo significativo ($p < 0,05$) sobre la variable respuesta (IFN- α 2b liberado entre 1 y 14 días), mientras que el EDTA mostró un efecto negativo. El resto de los aditivos (Manitol, Lisina, Tween 80 y Trehalosa) no ejercieron un efecto significativo en la liberación de la proteína.

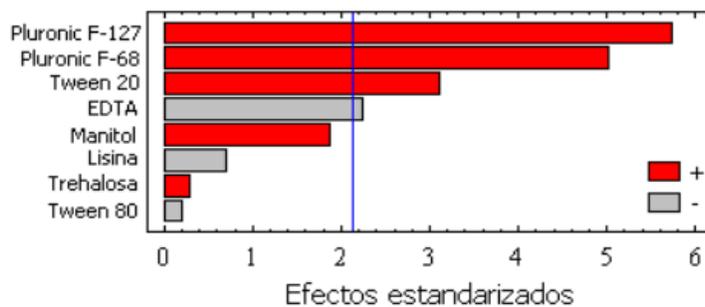


Figura 4.28. Representación de Pareto estandarizado para la liberación entre 1 y 14 días. La línea vertical en azul indica el umbral de significación.

Otros autores han encontrado también que los Pluronicos F-68 y F-127 aumentan la estabilidad de las proteínas durante el proceso de obtención de microesferas de PLGAs y por consiguiente, mejoran el perfil de liberación de la molécula encapsulada (123, 131, 181). Los Pluronicos son copolímeros tribloque ABA de polietilenglicol (hidrofílico) y polipropilenglicol (hidrofóbico) y son tensoactivos no iónicos en emulsiones aceite-agua y agua-aceite debido a que espontáneamente se insertan los bloques hidrofóbicos en la fase aceite y los hidrofílicos en la fase acuosa. Se ha propuesto que estos polímeros estabilizan las proteínas mediante el bloqueo de las interacciones hidrofóbicas presentes (123).

También se ha demostrado que el Tween 20 ayuda en la inhibición de las interacciones hidrofóbicas aunque a concentraciones altas (cerca de 50 mg/mL) puede causar cambio de la estructura secundaria de las proteínas (123).

Los resultados con trehalosa y manitol concuerdan con lo reportado por otros autores. Si bien los azúcares como la trehalosa y el manitol han sido usados en la estabilización de proteínas durante la liofilización ellos parecen tener muy poca efectividad en la estabilización durante la formación de emulsiones y otros procesos en los que las interacciones hidrofóbicas están presentes (118).

Estos resultados han demostrado la importancia de las interacciones hidrofóbicas tanto en la liberación inicial como en la liberación durante el resto del estudio *in vitro*. Además, en una aplicación futura de las microesferas de PLGAs cargadas con IFN- α 2b sería conveniente realizar estudios para incorporar los Pluronic como aditivos durante el proceso de encapsulación.

El análisis integral de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, correspondiente al estudio del efecto de la naturaleza de los componentes del sistema en las características de las microesferas obtenidas, permite afirmar que las interacciones hidrofóbicas que ocurren entre las proteínas encapsuladas y la matriz polimérica favorecen su encapsulación a la vez que dificultan su liberación. Esta última característica es más afectada en la medida en que las interacciones son más intensas, como sucede para el IFN- α 2b. En estas condiciones también se favorece la adsorción superficial de esta proteína. Lo anteriormente expuesto conlleva a pensar que el IFN- α 2b pudiera sufrir modificaciones en sus propiedades físico-químicas y biológicas luego de la encapsulación más fácilmente que el FCE. Este supuesto será estudiado en la tercera parte de este trabajo, dedicada a evaluar las características de las microesferas obtenidas con estas dos proteínas con vistas a su aplicación práctica para el desarrollo de productos biofarmacéuticos novedosos.

4.3 Evaluación de la utilidad de las microesferas obtenidas para el desarrollo de formulaciones de liberación modificada

4.3.1 Caracterización de las proteínas encapsuladas

El desarrollo de un sistema de liberación útil implica que las propiedades de la proteína encapsulada se conserven luego del proceso de microencapsulación (182). Debido a que los polímeros derivados del ácido láctico y glicólico no son solubles en agua es necesario diseñar un procedimiento para la extracción de la proteína encapsulada que permita analizar sus propiedades adecuadamente. El procedimiento de extracción que se diseñe debe cumplir los siguientes requisitos:

- tener un recobrado lo más cercano posible a 100% para caracterizar la proteína en su totalidad pues la extracción pudiera discriminar entre la especie nativa y modificaciones de la misma debidas a la encapsulación,
- que la proteína extraída quede en una muestra apropiada para aplicar las técnicas de caracterización de la misma sin interferencias,
- no introducir cambios adicionales en la molécula durante la extracción.

La información que existe en la literatura científica sobre la caracterización de proteínas encapsuladas es escasa, lo que pudiera deberse a que la caracterización exhaustiva de la molécula encapsulada se hace ineludible sólo cuando el sistema va a formar parte de un producto y a que el desarrollo de procedimientos de extracción que cumplan las características mencionadas es muy complejo.

Como se describió en el epígrafe 2.2.4 del capítulo de Revisión Bibliográfica, algunos investigadores han diseñado métodos para extraer las proteínas encapsuladas con vistas a su caracterización. La extracción por precipitación de la proteína con solventes orgánicos en los cuales el polímero es soluble (88, 100), la extracción mediante un sistema de dos fases líquidas inmiscibles (99), y la extracción mediante electroforesis (65, 100, 108) constituyen algunos ejemplos.

En este trabajo se estudiaron los métodos de extracción por precipitación y mediante un sistema de dos fases líquidas no miscibles.

4.3.1.1 Extracción del IFN- α 2b encapsulado por precipitación

Para extraer el IFN- α 2b encapsulado en microesferas de PLGA se diseñó primero un procedimiento basado en el método de precipitación descrito por Johnson y cols. en 1996 (100). Básicamente, el polímero en una mezcla de DCM y acetona 1:3 (v/v), centrifugar y recuperar la proteína precipitada la cual se seca y se resuspende en una solución acuosa apropiada para su análisis. Las características del IFN- α 2b presente en las microesferas y controles preparados para el estudio aparecen en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Muestras y controles preparados para la caracterización del IFN- α 2b extraído de las microesferas por precipitación con una mezcla de diclorometano y acetona 1:3 (v/v).

Muestra	Composición		Tratamiento	Propósito
	IFN- α 2b (μ g)	ME (mg)		
ME-IFN- α 2b (A)	160	20	Extracción	Muestra de ME en estudio
ME vacías (B)	-	20	Extracción	Verificar que los componentes de las ME no producen ninguna señal adicional en el ensayo (interferencia).
IFN- α 2b liofilizado (C)	160	-	Extracción	Determinar la solubilidad del IFN- α 2b en la mezcla de solventes
IFN- α 2b liofilizado (D)	160	-	Disolución en PBS	Referencia de la cantidad y características iniciales de la proteína liofilizada utilizada en los experimentos.
Mezcla de ME vacías con IFN- α 2b (E)	160	20	Extracción	Determinar si existen interacciones entre el IFN- α 2b y el polímero.
Mezcla liofilizada de ME vacías con IFN- α 2b (F)	160	20	Extracción	Determinar el efecto del proceso de liofilización en las interacciones entre el IFN- α 2b y el polímero.

* ME – Microesferas

** ME-IFN- α 2b – Microesferas con IFN- α 2b

La cantidad de IFN- α 2b recuperada mediante la extracción fue de $51 \pm 4\%$ (Figura 4.29, muestra A). El polímero no interfiere con el ensayo de microBCA para el IFN- α 2b ya que no se detectaron señales al analizar las muestras de microesferas vacías extraídas (muestra B en la Tabla 4.8 y la Figura 4.29). Sin embargo, el polímero y la proteína pueden interactuar impidiendo el recobrado cuantitativo de la proteína. Esta idea tiene su fundamento en los siguientes hechos:

- no se pierde IFN- α 2b al resuspenderlo individualmente en la mezcla de solventes (diclorometano:acetona (1:3 v/v)) (muestra C en la Tabla 4.8). En esta muestra el $96 \pm 4\%$ del interferón fue recuperado luego de la extracción de IFN- α 2b liofilizado (muestra C en la Figura 4.29). Este valor fue similar al obtenido al analizar una muestra equivalente de IFN- α 2b liofilizado (D en la Tabla 4.8 y la Figura 4.29) la cual fue disuelta directamente (no extraída) en PBS.
- los recobrados para muestras de referencia tales como las microesferas vacías mezcladas con IFN- α 2b (E en la Tabla 4.7 y la Figura 4.29) y una mezcla liofilizada de microesferas vacías e IFN- α 2b libre (F en la Tabla 4.8 y la Figura 4.22) fueron $100 \pm 5\%$ y $80 \pm 6\%$, respectivamente. El recobrado asociado a la muestra F fue menor que el correspondiente a otros controles (C y E en la Tabla 4.8 y la Figura 4.29), lo que pudiera asociarse a que la liofilización favorece que ocurran interacciones entre la proteína y el polímero. De hecho, otros autores han encontrado que las interacciones hidrofóbicas entre proteínas y polímeros pueden favorecerse durante los procesos de secado (57). El recobrado para la muestra F fue mayor que el obtenido para las microesferas de IFN- α 2b extraídas (muestra A en la Tabla 4.8 y la Figura 4.29).

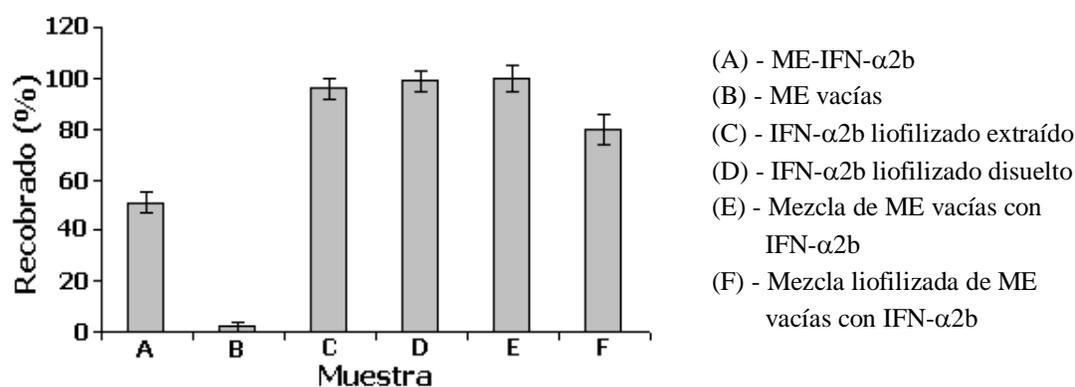


Figura 4.29. Recobrado de IFN- α 2b extraído mediante precipitación con DCM:acetona (1:3 v/v). La composición de las muestras y controles extraídos o disueltos directamente en PBS pH 7.2 se describe en la tabla 4.7. El recobrado fue calculado como el cociente entre la masa de interferón estimada por el ensayo de microBCA en las muestras extraídas o disueltas con respecto a la masa inicial presente en las muestras multiplicado por 100%.

Aunque no se recuperó todo el IFN- α 2b encapsulado, el análisis de la fracción extraída puede contribuir al análisis de las características de la proteína. De acuerdo con el análisis de las muestras por

SDS-PAGE, el interferón extraído de las microesferas presentó un 5,3% de dímero; este valor es similar al porcentaje calculado para los controles (4,6 y 6,6%) (Figura 4.30). Tampoco se detectaron señales de menor masa molecular.

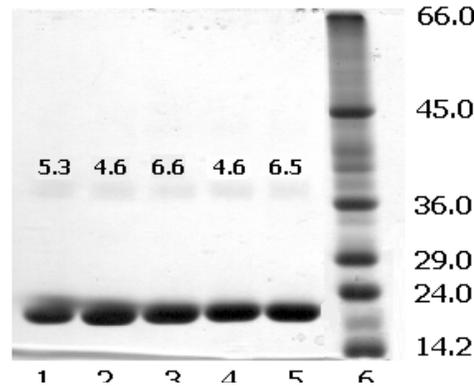


Figura 4.30. Electroforesis en gel de poliacrilamida, en condiciones no reductoras, de IFN- α 2b extraído de las microesferas (carril 1). Controles: carril 2) muestra resultante de la extracción de IFN- α 2b mezclado con microesferas vacías, carril 3) muestra resultante de la extracción de la mezcla liofilizada de IFN- α 2b y microesferas, carril 4) IFN- α 2b libre liofilizado y disuelto en PBS, pH 7.2 y carril 5) IFN- α 2b libre liofilizado y extraído. El carril 6 corresponde al patrón de masas moleculares. Los valores ubicados sobre las señales del dímero en cada muestra corresponden al porcentaje que representa esta fracción en la muestra.

Por otra parte, el análisis cromatográfico del IFN- α 2b extraído de las partículas presentó un perfil compuesto por una señal mayoritaria con un tiempo de retención de 36,24 min, el cual fue similar al de la muestra E (interferón libre mezclado con microesferas vacías seguido del procedimiento de extracción) (Figura 4.31). Los otros controles en estudio mostraron perfiles cromatográficos similares (datos no mostrados). Estos resultados son comparables con los publicados por Johnson y cols. al encapsular la hormona de crecimiento humana en microesferas de PLGA (100).

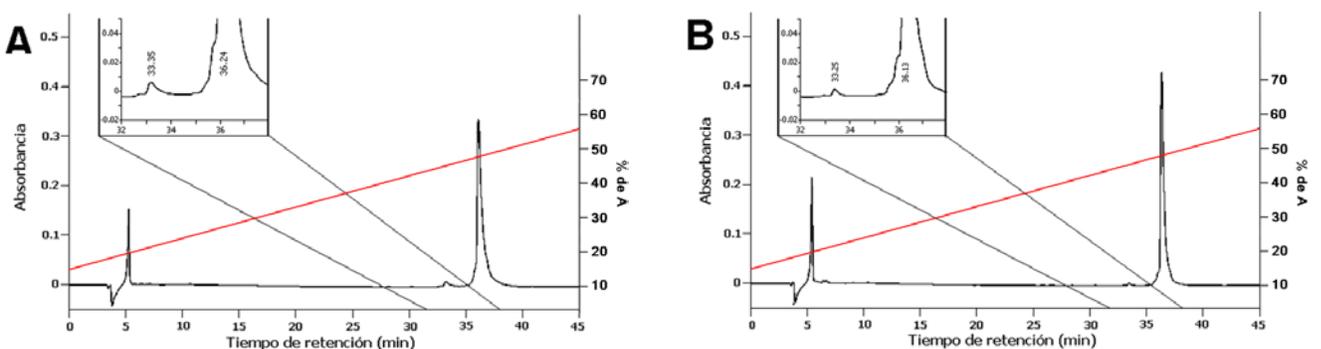


Figura 4.31. Perfil cromatográfico de muestras extraídas mediante la precipitación con DCM:acetona (1:3, v/v). A) IFN- α 2b extraído de las microesferas, B) IFN- α 2b extraído de la mezcla de la proteína con microesferas vacías.

El análisis de las muestras mediante el ELISA que emplea dos anticuerpos monoclonales mostró que sólo el $43 \pm 4\%$ del IFN- $\alpha 2b$ extraído de las microesferas fue inmunorreconocido (Figura 4.32 A). Ninguno de los controles mostró esta notable disminución en la inmunorreactividad contra los anticuerpos, el IFN- $\alpha 2b$ liofilizado disuelto directamente en PBS (muestra D en la Tabla 4.7) o extraído (muestra C en la Tabla 4.7) fueron inmunoreconocidos (111 ± 1 y $92 \pm 8\%$, respectivamente), así como el IFN- $\alpha 2b$ presente en la preparación obtenida al extraer la mezcla de microesferas vacías con la proteína libre (E en la Tabla 4.7) que también fue reconocido por los anticuerpos ($100 \pm 8\%$). Incluso, el interferón presente en la muestra obtenida al extraer la mezcla liofilizada de la proteína con microesferas vacías mostró un inmunorreconocimiento mayor ($83 \pm 1\%$) que la proteína encapsulada. Un resultado similar se obtuvo del análisis de las muestras mediante un ensayo de actividad antiviral *in vitro* (Figura 4.32 B).

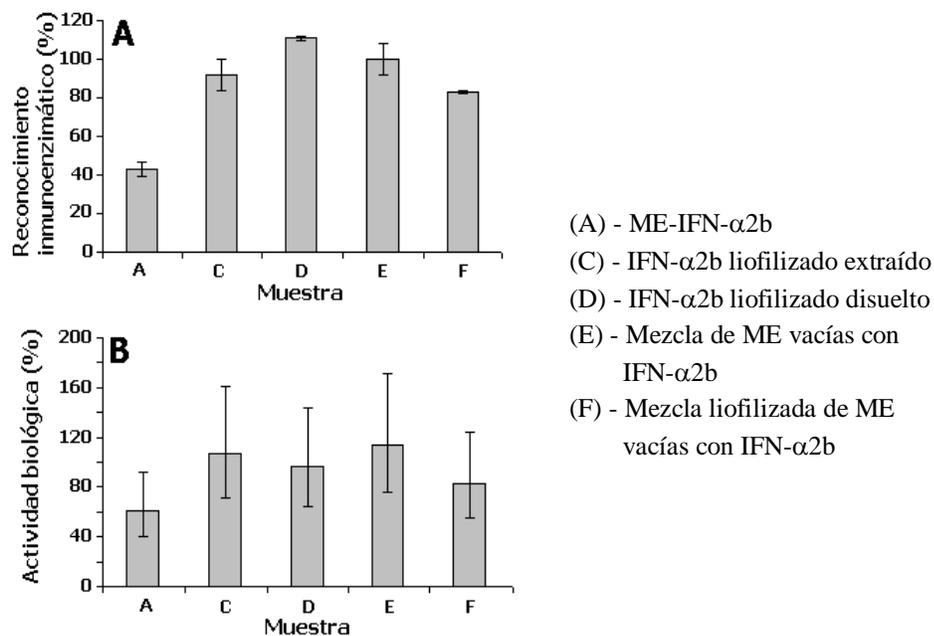


Figura 4.32. Características biológicas del IFN- $\alpha 2b$ extraído mediante la precipitación con DCM:acetona (1:3, v/v). Los datos corresponden al porcentaje del IFN- $\alpha 2b$ que fue inmunorreconocido por los anticuerpos monoclonales anti-IFN- $\alpha 2b$ empleados en el ensayo inmunoenzimático (A) o al porcentaje que conservó la actividad antiviral *in vitro* (B). Los valores fueron calculados con respecto a la masa del IFN- $\alpha 2b$ detectado, mediante el ensayo de microBCA, en las muestras extraídas o disueltas. El cálculo de la actividad antiviral fue realizado convirtiendo los datos primarios, expresados en UI, en valores de masa utilizando el valor de la actividad específica para este IFN- $\alpha 2b$ (2×10^8 IU/mg).

Estas observaciones son similares a las publicadas por otros investigadores que encapsularon lisozima en microesferas de PLGA, los cuales encontraron que la fracción de proteína liberada durante el primer

día de incubación en un medio acuoso conservó sus propiedades mientras que la fracción que permaneció en las microesferas estaba modificada (101, 126). Estos cambios en las proteínas microencapsuladas se han asociado fundamentalmente al efecto de algunas de las etapas del proceso de encapsulación que incluyen la formación de extensas interfases entre la solución acuosa de la proteína y la solución polimérica, el efecto del ultrasonido durante la dispersión de la solución de proteína en la solución polimérica, así como la congelación y deshidratación durante el secado (57).

Por estas razones la conservación de las propiedades de las proteínas constituye el mayor reto en el desarrollo de sistemas de liberación basados en microesferas de PLGAs.

Otras mezclas de solventes fueron empleadas con el propósito de aumentar el recobrado pero en ningún caso se logró extraer una fracción mayor de IFN- α 2b (resultados no mostrados).

Considerando que la cantidad de proteína recuperada con el método de precipitación fue sólo de $51 \pm 4\%$, se evaluó otro procedimiento de extracción basado en el empleo de un sistema de dos fases líquidas no miscibles. Como fase orgánica se empleó DCM y como fase acuosa se utilizó PBS.

4.3.1.2 Extracción del IFN- α 2b encapsulado mediante un sistema de dos fases líquidas no miscibles

Al tratar varias muestras de microesferas de IFN- α 2b con un sistema de dos fases líquidas no miscibles (fase orgánica: DCM, fase acuosa: PBS) se logró extraer sólo el $35 \pm 8\%$ de la proteína encapsulada y además se observó que la interfase formada fue poco definida. Este hecho, además de dificultar la recuperación de la fase acuosa, pudiera indicar de que parte de la proteína se adhiere a la interfase.

Teniendo en cuenta que las sustancias tensoactivas pueden reducir la adsorción de la proteína en la interfase y favorecer la distribución de esta hacia la fase acuosa del sistema de extracción (98), se diseñó un estudio para evaluar el efecto de adicionar una sustancia tensoactiva a la fase acuosa sobre el recobrado de la proteína extraída.

Sin embargo, debido a que algunos tensoactivos pueden interactuar con las proteínas y ocasionar cambios en la misma que alteren sus propiedades, así como originar interferencias en los ensayos mediante los cuales se cuantifican y/o caracterizan las proteínas, primero se evaluó la compatibilidad del IFN- α 2b con varias fases de extracción diferentes en cuanto al tensoactivo adicionado. Para ello se prepararon soluciones de IFN- α 2b en las diferentes fases de extracción a evaluar y se cuantificó la proteína mediante los ensayos habitualmente utilizados con este propósito: microBCA y ELISA. Como referencia se utilizó la fase de extracción sin aditivos (PBS). También se determinó el efecto de los tensoactivos sobre el perfil cromatográfico, por RP-HPLC, del IFN- α 2b.

Se obtuvieron 8 valores de concentración de IFN- α 2b para cada grupo experimental por cada una de las técnicas de cuantificación empleadas. El análisis de varianza realizado para los datos obtenidos por microBCA y para los obtenidos por ELISA arrojó que existen diferencias estadísticamente significativas en ambos casos ($p_{\text{microBCA}} = 0,0000$; $p_{\text{ELISA}} = 0,0000$). Mediante una prueba de Intervalos Múltiples de Duncan se determinó que sólo la muestra que contiene SDS no mostró diferencias significativas con la muestra de referencia en cuanto a la la cuantificación del IFN- α 2b mediante microBCA y ELISA. Los valores de la cuantificación individual de las muestras y los detalles del análisis estadístico pueden consultarse en el Anexo 3.

Este resultado indica que el SDS parece no interferir en la cuantificación de IFN- α 2b mediante las dos técnicas utilizadas: microBCA y ELISA.

Se estudió también el efecto de los tensoactivos en el perfil cromatográfico de la proteína mediante RP-HPLC. De acuerdo con la Figura 4.33 el perfil característico de la proteína en la fase de extracción sin aditivos presenta una señal única (a). El mismo perfil cromatográfico se obtuvo para el IFN- α 2b en presencia de todos los aditivos estudiados.

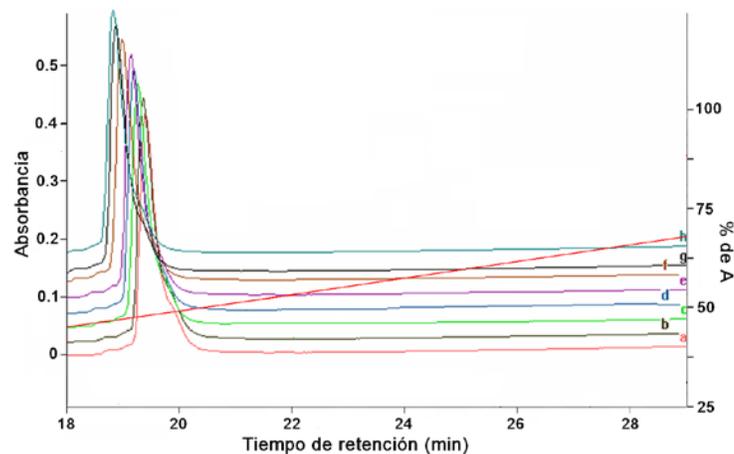


Figura 4.33. Cromatograma de IFN- α 2b en PBS sin aditivos (a) y en presencia de los diferentes tensoactivos: SDS (b), Triton X-100 (c), NP 40 (d), Tween 20 (e), Tween 80 (f), Pluronic F-68 (g), Pluronic F-127 (h).

A partir de estos resultados se seleccionó al SDS 0,1% en PBS como fase acuosa para la extracción del IFN- α 2b encapsulado en microesferas de PLGA. Como fase orgánica se emplea DCM.

Para evaluar la efectividad del procedimiento de extracción diseñado en la caracterización del IFN- α 2b encapsulado en microesferas de PLGA, se analizaron varias muestras experimentales con diversos valores de carga. Las muestras A-D se trataron además con PBS sin SDS con el propósito de comprobar la utilidad de la adición del tensoactivo a la fase acuosa del sistema de extracción.

En la Tabla 4.9 aparece la cantidad de IFN- α 2b presente en las muestras determinada mediante el ensayo de microBCA.

Tabla 4.9. Valores de concentración (C) y recobrado (R) de varios lotes de microesferas extraídas mediante un sistema de dos fases líquidas no miscibles (fase orgánica: DCM; fases acuosas: PBS y PBS+SDS al 0,1%).

Muestra	Q (%)	C Esperada ($\mu\text{g/mL}$)	C Determinada ($\mu\text{g/mL}$)		R (%)	
			PBS	PBS/SDS	PBS	PBS/SDS
A	0,5	100	26	107	26	107
B	1,27	254	95	275	37	108
C	0,44	88	41	87	47	99
D	0,45	90	35	93	38	104
E	0,77	154	42	160	27	104
F	1,48	296	ND	251	-	85
G	1,54	308	ND	288	-	94

Al incluir el SDS en la fase acuosa de la extracción aumenta significativamente ($p = 8,5 \times 10^{-8}$) la cantidad de proteína recuperada ($100 \pm 8\%$) con respecto a la cantidad que es posible extraer en ausencia del tensoactivo ($35 \pm 9\%$) (Figura 4.34).

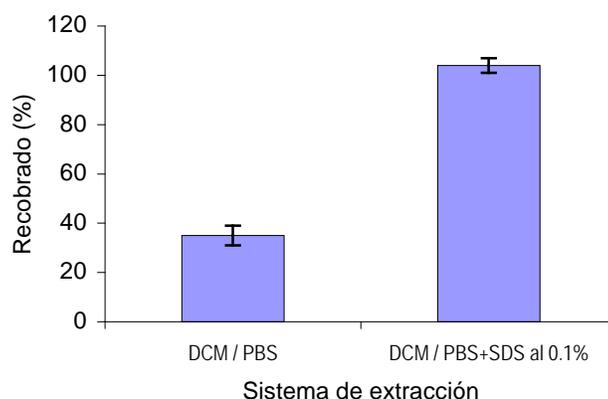


Figura 4.34. Recobrado promedio de IFN- α 2b proveniente de 5 lotes experimentales de microesferas extraídas con PBS y con PBS + SDS al 0.1% como fases acuosas (fase orgánica: DCM).

Se analizó, mediante SDS-PAGE, igual volumen de las muestras tratadas con los dos sistemas de extracción empleados. En todos los casos se observó que la señal de las muestras extraídas con SDS al 0,1% en la fase acuosa es más intensa y se comprobó que el aumento en la cantidad de IFN- α 2b cuantificado se debe a la presencia de este en la fase acuosa, es decir, al aumento de la cantidad de proteína extraída y no a un efecto de sobreestimación de la concentración de proteína cuantificada por microBCA. Se verificó que en todos los casos se extrae mayor cantidad de IFN- α 2b con la fase acuosa que contiene SDS (Figura 4.35). Además, se detectó mayor masa de proteína en las muestras de microesferas con mayor cantidad de IFN- α 2b por masa de microesferas: $B > E > A \approx C \approx D$ (ver la carga de las microesferas en la Tabla 4.9, segunda columna). Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante la cuantificación de IFN- α 2b en las muestras por el ensayo de microBCA.

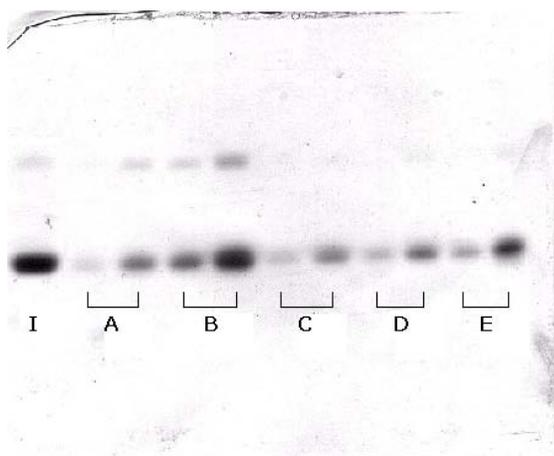


Figura 4.35. Electroforesis en gel de poliacrilamida (en condiciones no reductoras) de IFN- α 2b proveniente de 5 lotes experimentales de microesferas (A, B, C, D y E), extraído con DCM/PBS (señal a la izquierda) y DCM/PBS + SDS al 0,1% (señal a la derecha). I) Patrón de IFN- α 2b.

Se verificó que el IFN- α 2b no sufre modificaciones en sus propiedades por efecto del procedimiento de extracción en dos fases líquidas a partir de practicar dicho procedimiento a una muestra construida con microesferas vacías y una cantidad conocida de la proteína (MEv + IFN- α 2b). El IFN- α 2b recuperado en la fase acuosa al tratar la muestra construida fue de 100% teniendo en cuenta la proteína cuantificada mediante el ensayo de microBCA y se puede considerar que la misma conservó las propiedades que le permiten ser reconocida por los anticuerpos monoclonales del sistema ELISA empleado ya que se cuantificó por esta técnica también el 100% de la proteína extraída (Tabla 4.10, segunda fila). Sin embargo, del IFN- α 2b extraído de las microesferas (Tabla 4.10, última fila) sólo el 60% fue reconocido

por los anticuerpos. El perfil cromatográfico, por RP-HPLC, de las muestras evaluadas fue similar (Figura 4.36).

Tabla 4.10. Concentración de IFN- α 2b determinada mediante los ensayos de microBCA y ELISA.

Muestra	IFN- α 2b esperado ($\mu\text{g/mL}$)	IFN- α 2b determinado por microBCA ($\mu\text{g/mL}$)	R (%)	IFN- α 2b determinado por ELISA ($\mu\text{g/mL}$)	R (%)
Referencia	250	260 \pm 10	105 \pm 5	250 \pm 10	100 \pm 5
MEv + IFN- α 2b	250	250 \pm 20	100 \pm 10	240 \pm 20	100 \pm 10
ME- IFN- α 2b	296	290 \pm 20	100 \pm 10	160 \pm 30	60 \pm 20

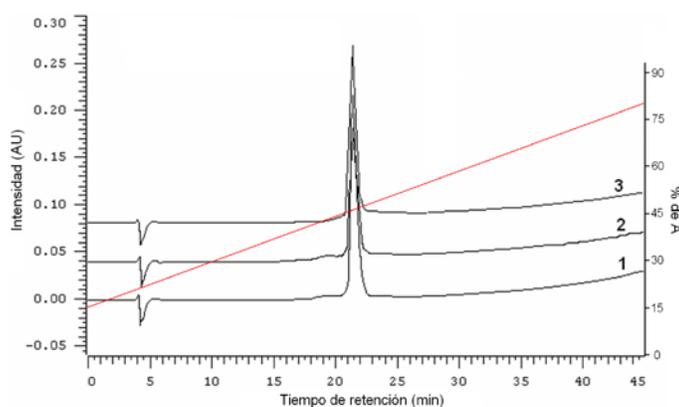


Figura 4.36. Cromatogramas del IFN- α 2b extraído de una muestra de microesferas (1) y de una muestra construida con microesferas vacías y una cantidad conocida de la proteína (2). Como referencia se empleó una solución de IFN- α 2b sin tratamiento (3). La extracción se realizó con DCM como fase orgánica y PBS con SDS al 0,1% como fase acuosa.

De estos resultados se concluye que el IFN- α 2b encapsulado puede ser extraído cuantitativamente y en forma adecuada para su caracterización físico-química y biológica utilizando un sistema de dos fases líquidas no miscibles que emplea DCM como fase orgánica y PBS con SDS al 0,1%.

Para evaluar las características físico-químicas y biológicas del IFN- α 2b encapsulado en las microesferas mediante el sistema diseñado se realizaron los siguientes análisis:

1) Evaluación, mediante SDS-PAGE, de la presencia de especies de diferente masa molecular que la molécula nativa en el IFN- α 2b extraído

Al analizar la Figura 4.35 no se encontraron especies de menor masa molecular lo que indica que no se produce degradación (perceptible por esta técnica) del IFN- α 2b durante la microencapsulación. Sin

embargo, la cantidad de proteína agregada es mayor en las muestras de IFN- α 2b extraído de las microesferas con respecto a la muestra de la proteína sin encapsular que se empleó como referencia. Es decir, como consecuencia del proceso de encapsulación aumenta la fracción de proteína agregada.

2) Perfil cromatográfico del IFN- α 2b por RP-HPLC

Las muestras F y G (descritas en la Tabla 4.9) fueron analizadas mediante RP-HPLC y se observó que el perfil cromatográfico fue similar al de la proteína antes de encapsular (Figura 4.37).

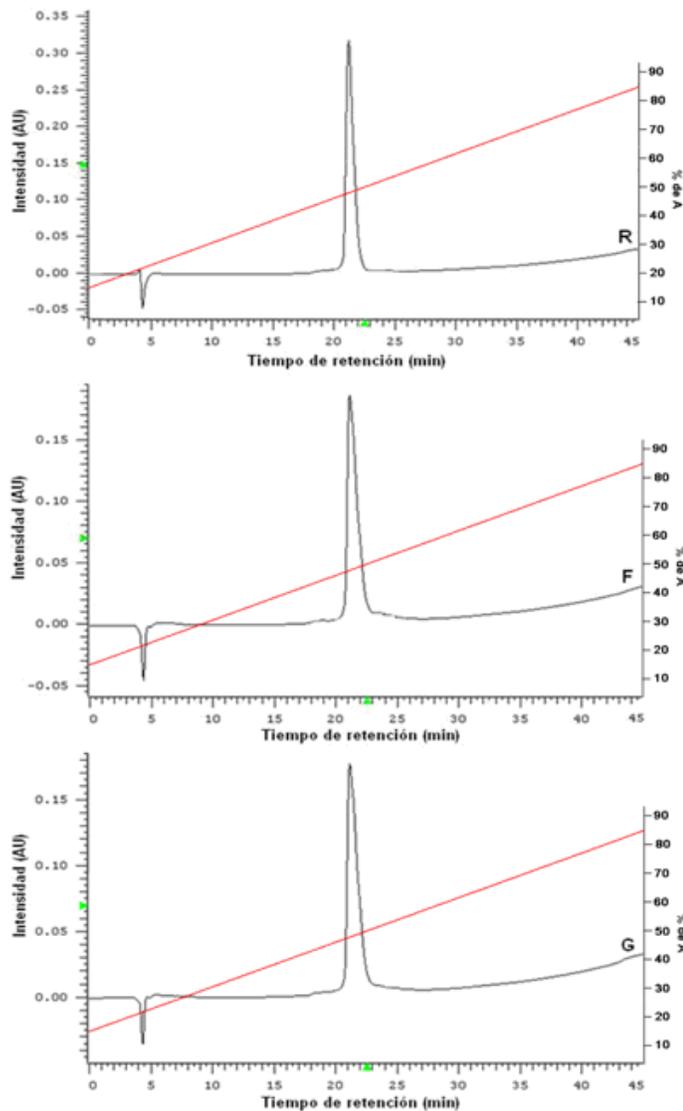


Figura 4.37. Cromatogramas del IFN- α 2b extraído de dos muestras de microesferas (F y G, Tabla 4.9) y de IFN- α 2b sin encapsular tomado como referencia (R). La extracción se realizó con DCM como fase orgánica y PBS con SDS al 0,1% como fase acuosa.

3) Reconocimiento inmunoenzimático por los anticuerpos monoclonales del ELISA

El IFN- α 2b extraído de todas las muestras (A-G, Tabla 4.9) se estudió mediante la determinación de la fracción de proteína que fue reconocida por los anticuerpos monoclonales anti-IFN- α 2b que se emplean en el ELISA. En todas las muestras el reconocimiento inmunoenzimático de la proteína encapsulada disminuyó notablemente a $53 \pm 10\%$ como promedio con respecto al IFN- α 2b sin encapsular que fue reconocido totalmente (Figura 4.38); sólo la muestra B conservó en mayor grado esta propiedad (73%). Este resultado es similar al obtenido en el análisis de muestras extraídas mediante precipitación con la mezcla de DCM y acetona a pesar de que con ese método sólo se logró extraer la mitad de la proteína encapsulada (ver el epígrafe 4.3.1.1).

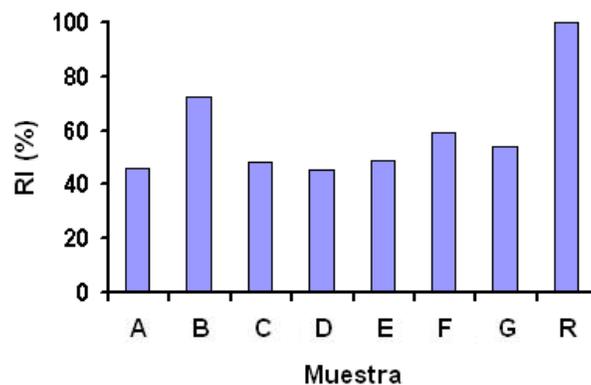


Figura 4.38. Reconocimiento inmunoenzimático del IFN- α 2b extraído de lotes experimentales de microsferas (A-G) mediante el sistema de dos fases líquidas no miscibles, con DCM como fase orgánica y PBS con SDS al 0,1% como fase acuosa. R: IFN- α 2b sin encapsular utilizado como referencia.

La actividad biológica del IFN- α 2b extraído se analizó en la muestra G (Tabla 4.8) mediante la cuantificación de la inhibición del efecto citopático producido por el virus Mengo sobre células Hep-2. La actividad antiviral específica del IFN- α 2b extraído ($1,4 \times 10^8$ UI/mL) fue menor que la de la proteína antes de encapsular (2×10^8 UI/mL) lo que representa el 73% de la actividad biológica inicial de la proteína utilizada para encapsular.

A partir del análisis de las muestras de IFN- α 2b extraídas de las microsferas por diferentes procedimientos, es posible decir que:

- no existen evidencias de que, como consecuencia del proceso de encapsulación, la estructura primaria la proteína sufrió cambios detectables por SDS-PAGE o RP-HPLC,
- una parte del IFN- α 2b encapsulado se encuentra agregado,

-la conformación espacial del IFN- α 2b encapsulado fue afectada en cierto grado por el proceso de encapsulación (detectado mediante el análisis del reconocimiento inmunoenzimático de dos anticuerpos monoclonales de un sistema de ELISA y de la actividad antiviral).

4.3.1.3 Extracción del FCE encapsulado mediante un sistema de dos fases líquidas no miscibles

De forma similar a lo sucedido con el IFN- α 2b, las extracciones realizadas con PBS como fase acuosa presentaron un recobrado bajo de FCE (entre 58 y 73%). Con el objetivo de aumentar el recobrado de la extracción se diseñó un estudio para determinar el efecto de la adición de una sustancia tensoactiva en la fase acuosa. Primero se estudió la compatibilidad de los tensoactivos con el FCE y con las técnicas de cuantificación empleadas para determinar la concentración de esta proteína en las muestras.

De igual forma que en el estudio realizado con el IFN- α 2b, se prepararon mezclas de FCE con cada una de las fases acuosas evaluadas (PBS (empleada como referencia) y PBS con aditivos (SDS, Tritón X-100, NP-40, Tween 20, Tween 80, Pluronic F-68 y Pluronic F-127)). Todos los tensoactivos se utilizaron a una concentración de 0,1%; y se determinó la concentración de FCE en las mezclas mediante los ensayos de microBCA y ELISA. Se evaluó además el efecto de los tensoactivos en el perfil cromatográfico, por RP-HPLC, del FCE.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de concentración de FCE determinados por microBCA ($p_{\text{microBCA}} = 0,0001$) y por ELISA ($p_{\text{ELISA}} = 0,0001$) al analizar mediante un ANOVA los valores calculados para los grupos experimentales. Al analizar las muestras mediante la prueba de Intervalos Múltiples de Duncan se obtuvo que sólo las fases que contienen SDS y Pluronic F-68 permiten cuantificar al FCE, mediante el ensayo de microBCA, sin diferencias con respecto a la fase de extracción sin aditivos y que, por medio del ELISA es posible cuantificar al FCE sin diferencias con la muestra de referencia en presencia de todas las sustancias tensoactivas empleadas excepto con Pluronic F-127. Los valores de la cuantificación de las muestras y los detalles del análisis estadístico pueden consultarse en el Anexo 4.

Al analizar por RP-HPLC las muestras en estudio se comprobó que el perfil cromatográfico del FCE se afecta notablemente por la presencia del SDS (Figura 4.39). Se observa un corrimiento de las señales hacia tiempos de retención mayores indicando la formación de especies más hidrofóbicas; además, el ancho de las señales aumenta lo que pudiera indicar que la transformación ocurrida no es única sino que se produce una familia de especies que no son resueltas por la técnica empleada.

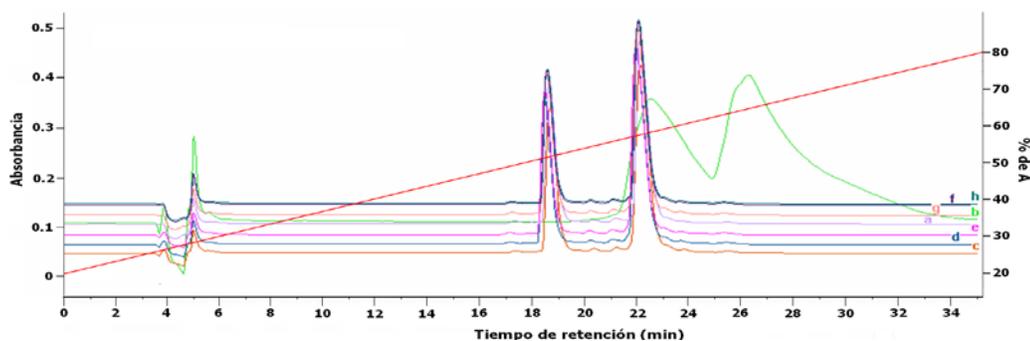


Figura 4.39. Cromatograma de FCE en PBS sin aditivos (a) y en presencia de diferentes tensoactivos: SDS (b), Tritón X-100 (c), NP 40 (d), Tween 20 (e), Pluronic F-127 (f), Tween 80 (g), Pluronic F-68 (h).

Teniendo en cuenta estos resultados se puede decir que, la presencia de SDS y Pluronic F-68, ambos al 0,1% en muestras que contienen FCE no interfieren en la cuantificación adecuada del mismo por microBCA y ELISA; sin embargo, el efecto negativo del SDS sobre el perfil cromatográfico por RP-HPLC del FCE, no permite utilizarlo en el sistema de extracción. Por esta razón se seleccionó el Pluronic F-68 como aditivo de la fase acuosa del sistema de extracción diseñado para la caracterización del FCE encapsulado.

La efectividad de incluir Pluronic F-68 en la fase acuosa del sistema de extracción fue estudiada a partir de la determinación del recobrado de FCE extraído de microsferas en presencia y ausencia del tensoactivo. Se comprobó que existían diferencias en la recuperación del FCE en la fase acuosa, siendo cercano a 100% el recobrado de la proteína en presencia del aditivo (Tabla 4.11). Debe destacarse que, independientemente de la cantidad de FCE extraído, el 100% es reconocido por los anticuerpos del ELISA. La cantidad de proteína determinada, mediante los ensayos de microBCA y ELISA, al utilizar el sistema de extracción con el Pluronic F-68 al 0,1% fue cercana a 100% al igual que en la muestra de referencia evaluada (FCE en PBS a una concentración conocida).

Tabla 4.11. Concentración de FCE mediante los ensayos de microBCA y ELISA en las soluciones acuosas recuperadas del sistema de extracción.

Muestra	FCE esperado (µg/mL)	FCE determinado por microBCA (µg/mL)	R (%)	FCE determinado por ELISA (µg/mL)	R (%)
Extracción sin Pluronic F-68	206	147	71	148	72
Extracción con Pluronic F-68	206	218	106	202	98
Referencia	1000	1091	109	1062	106

La adición de un agente tensoactivo en la fase acuosa del sistema de extracción en dos fases líquidas no miscibles ha favorecido la recuperación de las dos proteínas encapsuladas en este trabajo. Este hecho pudiera deberse a que, durante la extracción, parte de las proteínas quedan atrapadas en la interfase

como consecuencia de la presencia en ellas de zonas de naturaleza hidrofílica y zonas de naturaleza hidrofóbica. Las sustancias tensoactivas desfavorecieron la ocurrencia de las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y las interfases con el consiguiente aumento de su recobrado en la fase acuosa.

Las muestras de FCE extraído también fueron analizadas por RP-HPLC con el objetivo de conocer si se introducía alguna variación en el perfil cromatográfico de FCE o aparecían nuevas señales debidas a los demás componentes de la muestra. Como se observa en la Figura 4.40, todos los cromatogramas muestran el perfil típico del FCE (dos señales correspondientes a las especies de 51 y 52 aa).

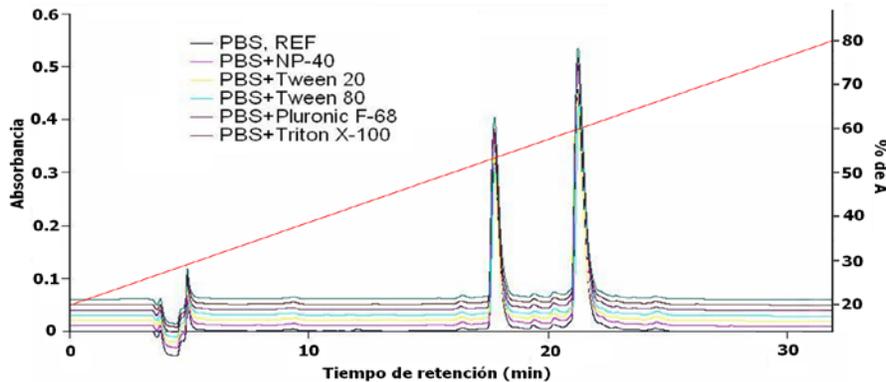


Figura 4.40. Cromatogramas de FCE extraído de las microesferas con PBS sin aditivos (PBS, REF) y PBS con los diferentes tensoactivos: Tritón X-100, NP 40, Tween 20, Tween 80, Pluronic F-68, Pluronic F-127.

Para estudiar el efecto del procedimiento de extracción en las propiedades de la proteína extraída se mezclaron microesferas vacías con la proteína libre (MEv + FCE) y se analizó el FCE presente en la muestra mediante microBCA, ELISA, RP-HPLC y actividad biológica. Como referencia se empleó una muestra de FCE en PBS (referencia). También se incluyó en el ensayo una muestra de microesferas cargadas con FCE (ME-FCE).

Los resultados que aparecen en la Tabla 4.12 muestran que todo el FCE cuantificado por el ensayo de microBCA fue reconocido por los anticuerpos del ELISA en la muestra de FCE mezclado con las microesferas vacías que fue sometida al procedimiento de extracción. Esto nos permite afirmar que el procedimiento de extracción no afecta la capacidad de la proteína para ser reconocida por los anticuerpos monoclonales empleados en esta técnica. Por otra parte, esta muestra también es biológicamente activa ya que su actividad específica se encuentra por encima del límite mínimo para considerar que el FCE presenta una actividad biológica adecuada, el cual es de 500 000 UI/mL.

Tabla 4.12. Concentración de FCE en las muestras extraídas determinada mediante los ensayos de microBCA y ELISA, y valores de actividad específica.

Muestra	FCE esperado ($\mu\text{g/mL}$)	FCE determinado por microBCA ($\mu\text{g/mL}$)	R (%)	FCE determinado por ELISA ($\mu\text{g/mL}$)	R (%)	Actividad Específica (UI/mg)	
						Límite*	Real
Referencia	200	230 ± 10	115 ± 5	250 ± 10	125 ± 5		900 000
MEv + FCE	200	230 ± 20	110 ± 10	230 ± 20	110 ± 10	500 000	537 105
ME-FCE	206	200 ± 20	100 ± 10	220 ± 20	110 ± 10		688 507

* Valor mínimo de actividad específica para considerar que el FCE tiene una actividad biológica adecuada.

El perfil cromatográfico por RP-HPLC de las tres muestras fue similar (Figura 4.41) por lo que puede decirse que el procedimiento de extracción no introduce ninguna modificación química en la molécula.

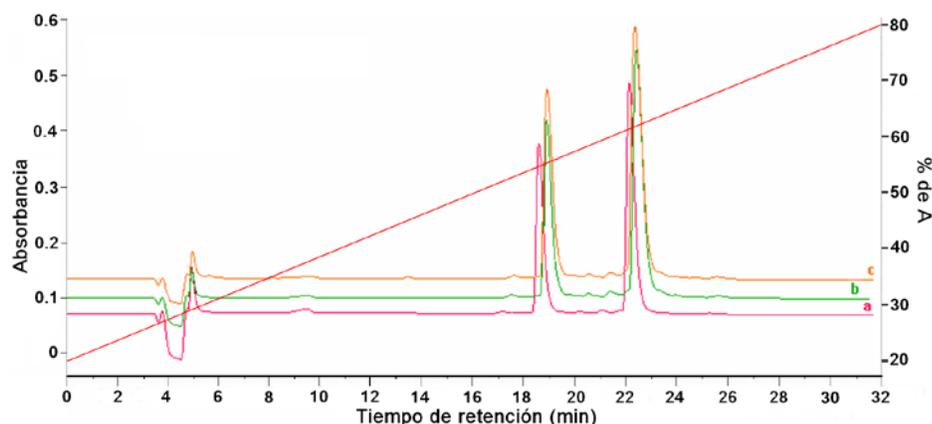


Figura 4.41. Cromatogramas de FCE: (a) disuelto en PBS, (b) extraído de una mezcla de la proteína con las microesferas vacías y (c) extraído de microesferas cargadas con FCE.

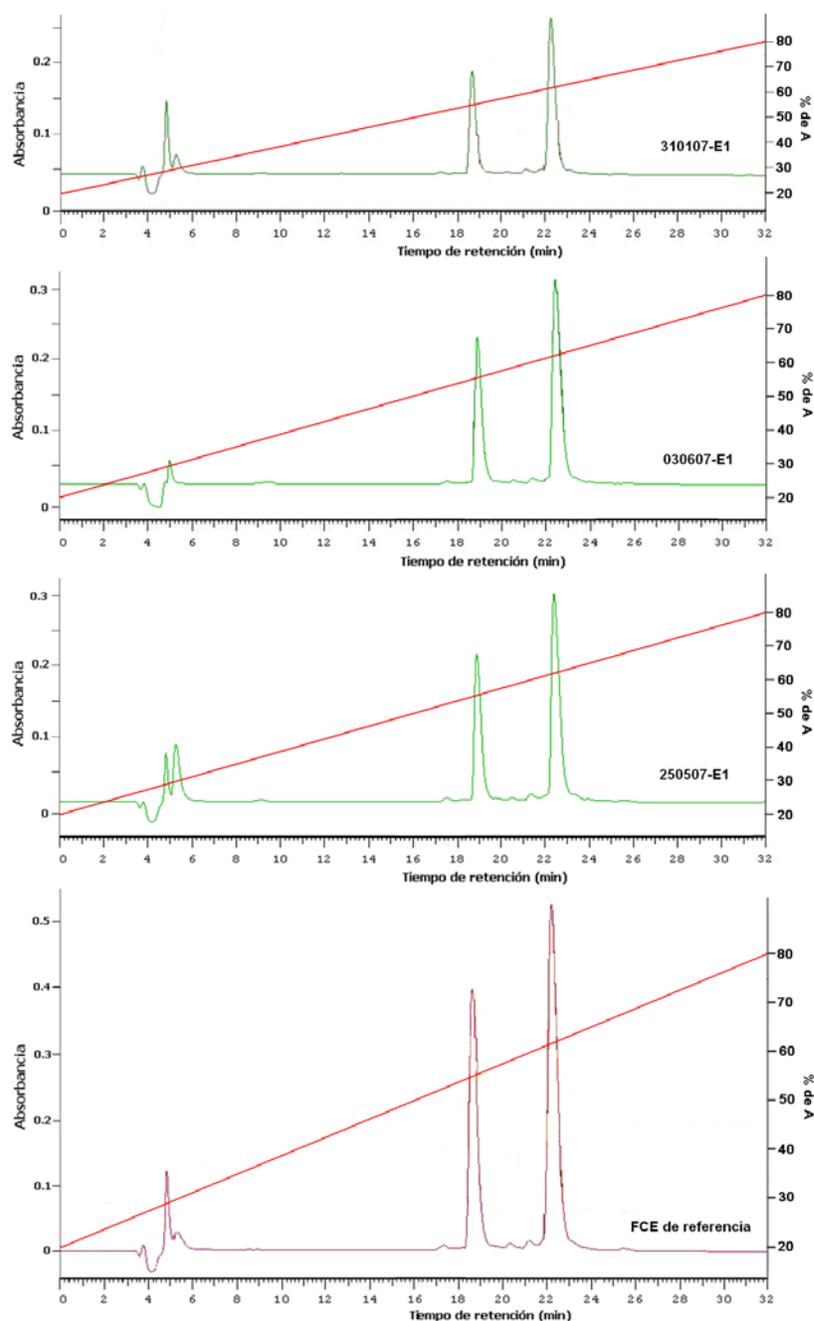
Teniendo en cuenta los resultados es posible decir que el procedimiento de extracción que emplea como fase acuosa PBS con Pluronic F-68 al 0,1% y DCM como fase orgánica, no induce cambios en las propiedades del FCE.

El análisis de tres lotes experimentales de microesferas cargadas con FCE permitió conocer que esta proteína conserva sus propiedades físico-químicas y biológicas luego del proceso de microencapsulación (Tabla 4.13, Figura 4.42). El FCE extraído conservó casi completamente su capacidad para ser reconocido por los anticuerpos del ELISA, mientras que la actividad específica de la proteína extraída se mantuvo por encima del límite a partir del cual se considera que presenta actividad biológica adecuada (500 000 UI/mg) (Tabla 4.13). El perfil cromatográfico del FCE extraído de los tres lotes es igual al del FCE sin encapsular (Figura 4.42).

Tabla 4.13. Concentración de FCE determinada por microBCA y ELISA y valores de actividad específica de las muestras resultantes de la extracción de tres lotes experimentales de microesferas.

Lotes	FCE esperado ($\mu\text{g/mL}$)	FCE determinado por microBCA ($\mu\text{g/mL}$)	R (%)	FCE determinado por ELISA ($\mu\text{g/mL}$)	R (%)	Actividad Específica (UI/mg)	
						Límite*	Real
060307-E1	103	100 ± 10	100 ± 10	110 ± 10	120 ± 10		1 000 000
310107-E1	51	60 ± 20	110 ± 40	45 ± 1	88 ± 2	500 000	651 652
250507-E1	36	39 ± 7	110 ± 20	34 ± 6	90 ± 20		1 836 833

* Valor mínimo de actividad específica para considerar que el FCE tiene una actividad biológica adecuada.

**Figura 4.42.** Cromatogramas de FCE extraído de tres lotes de microesferas con PBS/Pluronic F-68 y de una muestra de referencia (FCE en PBS).

4.3.2 Otras propiedades de las microesferas

Anteriormente se describieron algunas características de las microesferas obtenidas que resultan adecuadas si estas van a ser utilizadas para diseñar un producto biofarmacéutico. Por ejemplo, presentan un tamaño apropiado para ser inyectadas (ver los epígrafes 4.1.1.2 y 4.1.2) y la carga deseada puede seleccionarse, de acuerdo con la dosis que se necesita administrar, a partir de la determinación de la relación matemática entre esta propiedad y parámetros experimentales como la concentración de la proteína en la fase acuosa interna (ver el epígrafe 4.1.1). Sin embargo, existen otras propiedades que deben cumplir estas microesferas para ser utilizadas en el desarrollo de un medicamento: baja humedad residual, cantidad de solvente residual por debajo del límite establecido por las agencias reguladoras y esterilidad.

La humedad residual fue siempre menor que 2,5%. Este valor puede considerarse apropiado si se compara con otras preparaciones que se han comercializado. Por ejemplo, para las microesferas de PLGA cargadas con hormona de crecimiento humana desarrolladas a escala de laboratorio se reportó una humedad residual de $1,7 \pm 0,7\%$ (63). La cantidad de DCM residual fue siempre menor que 1 mg/g; este valor se encuentra por debajo del límite mínimo establecido por las agencias reguladoras el cual es de 6 mg/g (91). Se obtuvieron microesferas estériles mediante la realización del procedimiento de encapsulación en condiciones asépticas.

La evaluación de estas propiedades se describe detalladamente en el Anexo 5.

4.3.3 Evaluación in vivo de las microesferas cargadas con IFN- α 2b y FCE

4.3.3.1 Interferón alfa-2b

Se detectó IFN- α 2b en el suero de los conejos durante 6 días. Se alcanzó la concentración máxima de la citocina en suero a las 6 horas luego de la administración de las microesferas, y la concentración de la proteína fue disminuyendo hasta llegar prácticamente a cero a los 6 días. Aunque las concentraciones detectadas fueron bajas, se puede decir que existe un comportamiento del IFN- α 2b en suero diferente del que se obtiene al administrar la proteína sin encapsular a través de la misma vía. El IFN- α 2b libre desaparece de la circulación sanguínea más rápidamente que el administrado en microesferas poliméricas (Figura 4.43). El hecho de que después de 24 horas se detecte IFN- α 2b en el suero de los conejos, nos indica que existe una liberación de la proteína posterior a la que ocurre inicialmente durante el primer día al incubar las microesferas *in vitro*. Por esta razón el sistema puede, potencialmente, modificar la liberación de IFN- α 2b.

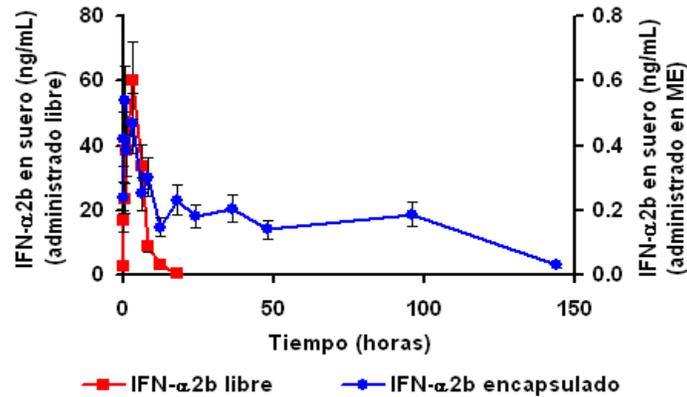


Figura 4.43. Concentración de IFN- α 2b en el suero de conejos tratados con microesferas cargadas con IFN- α 2b e IFN- α 2b libre.

4.3.3.2 Factor de Crecimiento Epidérmico

- *Evaluación farmacocinética exploratoria*

En la Figura 4.44 se muestra el comportamiento de la concentración sérica de FCE administrado en solución acuosa y encapsulado en microesferas poliméricas biodegradables.

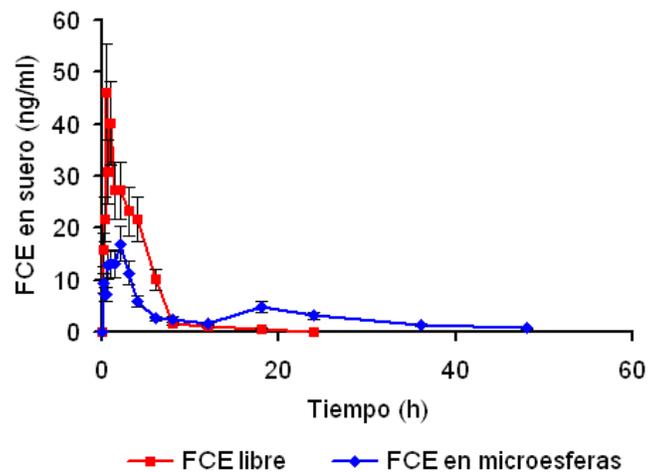


Figura 4.44. Concentración sérica de FCE administrado libre y encapsulado en microesferas a conejos machos Nueva Zelanda.

El tiempo al que se alcanza la concentración máxima de FCE fue mayor cuando se administró encapsulado en las microesferas. Esto sugiere que existe una liberación de la proteína posterior a la que sale de las partículas durante las primeras horas luego de la administración.

El hecho de que la concentración máxima de FCE es menor cuando se administra encapsulado está relacionado con las características de las microesferas, que no liberan la proteína de una vez sino que durante el primer día se libera sólo una fracción de la dosis total administrada. En cambio todo el FCE administrado en forma libre se encuentra disponible en el sitio de aplicación una vez depositado en él.

Se evaluó el tiempo medio de residencia como un indicador de la duración de la respuesta terapéutica. Este parámetro fue de 27,51 h para el FCE encapsulado en las microesferas de PLA, el cual es significativamente mayor ($p = 0,0059$) que el determinado para la proteína libre (3,68 h).

- Evaluación farmacodinámica exploratoria

El FCE encapsulado se administró mediante infiltraciones en el fondo y bordes de heridas de grosor total realizadas en ratas Wistar de sexo masculino. Las microesferas de FCE se administraron una vez mientras que el FCE libre fue administrado 3 veces por semana durante una semana. El examen histológico de las muestras tomadas de las heridas al finalizar el estudio arrojó que:

- No existen evidencias de reacción a cuerpo extraño en el sitio de administración de las microesferas.
- Existe más colágeno en las heridas tratadas con el FCE encapsulado y su organización es mayor lo cual se infiere de la orientación horizontal de las fibras con respecto al borde de las heridas en comparación con la ausencia de orientación de este en las heridas no tratadas (Figura 4. 45 A y B).
- Existe mayor cantidad de vasos sanguíneos funcionales en las heridas tratadas con las microesferas de FCE con respecto a las no tratadas (Figura 4.45 C y D).

Los resultados de estos dos estudios constituyen una evidencia de la capacidad del sistema para liberar el FCE *in vivo* de forma sostenida y con su actividad biológica conservada, lo cual soporta la utilidad de las microesferas cargadas con FCE obtenidas en este trabajo para, una vez optimizadas, diseñar sistemas novedosos de liberación de esta proteína.

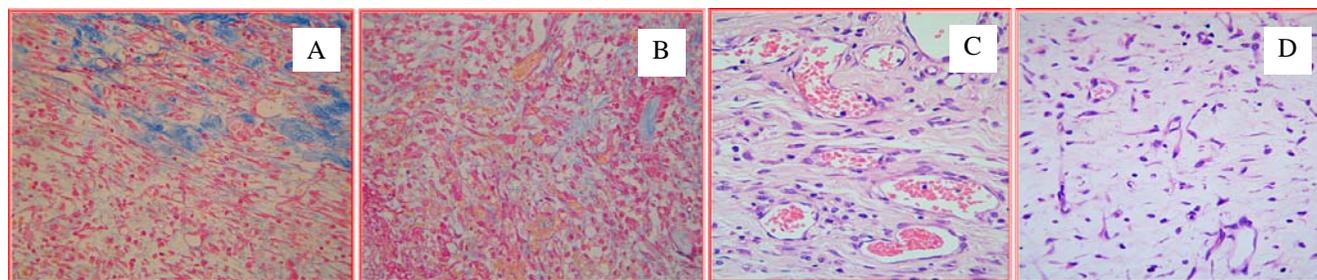


Figura 4.45. Imágenes histológicas de los cortes realizados en las heridas de grosor total practicadas en ratas, tratadas con FCE encapsulado en microesferas de PLA (A y C) y no tratadas (B y D). Se observa más organización del colágeno (A) y mayor cantidad de vasos sanguíneos funcionales (C) en las heridas tratadas con FCE encapsulado (A y C) con respecto a las heridas no tratadas (B y D).

5 Conclusiones

1. En la encapsulación de IFN- α 2b y FCE en matrices derivadas de los ácidos láctico y glicólico mediante la técnica de doble emulsión - evaporación del disolvente, la concentración y el volumen de la fase acuosa interna, la velocidad de agitación de la segunda emulsión y la forma de preparar la primera emulsión influyen notablemente en la carga, la eficiencia de encapsulación, el tamaño de las partículas y el perfil de liberación de las dos proteínas.
2. Al encapsular IFN- α 2b y FCE en las matrices de PLGA utilizadas en este trabajo resulta ventajoso seleccionar la concentración de la proteína y el volumen de la fase acuosa interna a partir de la relación matemática de estos con Q y EE, mientras que es mejor realizar la primera emulsión con 100 μ L de la fase acuosa interna y mediante: *i*) ultrasonido para el IFN- α 2b y *ii*) un dispersor tipo Ultraturax para el FCE.
3. Las interacciones hidrofóbicas entre la matriz polimérica y las proteínas: *i*) favorecen su encapsulación, *ii*) dificultan la liberación de las mismas que, con los polímeros usados en este trabajo, ocurre principalmente por difusión y *iii*) afectan las propiedades físico-químicas y biológicas de estas biomoléculas. La co-encapsulación de aditivos que bloquean estas interacciones, como los Pluronic y el Tween 20, aumenta la liberación de IFN- α 2b.
4. El cálculo teórico de la superficie hidrofóbica de la proteína encapsulada permite fundamentar el comportamiento de la misma frente a su encapsulación en matrices de PLGAs.
5. La liberación del IFN- α 2b y el FCE es favorecida por características del PLGA tales como: *i*) mayor porcentaje del monómero lactida, *ii*) menor masa molecular y *iii*) la presencia de un grupo carboxílico al final de la cadena polimérica.
6. La extracción en dos fases líquidas, que incluye un tensoactivo en la fase acuosa, permite extraer cuantitativamente al IFN- α 2b y FCE encapsulados para su análisis químico-físico y biológico. La encapsulación en matrices de PLGAs afecta al IFN- α 2b pero no al FCE.
7. La administración de IFN- α 2b y FCE en microesferas de PLGAs permite aumentar el tiempo en que estas proteínas son detectables en suero de conejo respecto a cuando se administra la proteína libre. La administración intralesional del FCE encapsulado en microesferas de PLA tiene un efecto cicatrizante.

6 Recomendaciones

1. Estudiar el empleo de polímeros más hidrofílicos para la encapsulación del IFN- α 2b como una alternativa para resolver la liberación incompleta que experimenta esta proteína cuando es encapsulada en matrices de PLGAs.
2. Valorar la inclusión de aditivos en la microencapsulación de IFN- α 2b que contribuyan a mejorar su liberación y estabilidad. Determinar, mediante un diseño experimental, el más apropiado para lograr las características deseadas en cuanto al perfil de liberación de la proteína y su estabilidad físico-química y biológica luego del proceso de encapsulación.
3. Explorar el uso de la técnica de FTIR como una herramienta para evaluar la estructura del IFN- α 2b y el FCE en el interior de las microesferas. De ser posible, combinar el uso de esta técnica con el dicroísmo circular “en fase sólida” para estudiar los posibles cambios conformacionales del IFN- α 2b adsorbido en matrices de PLGAs.
4. Estudiar la utilidad de otros parámetros derivados de los cálculos teóricos basados en la modelación de la estructura de proteínas como indicadores del comportamiento de las mismas frente a su encapsulación en matrices de PLGAs.
5. Utilizar las matrices más favorables para realizar los futuros estudios *in vivo* de las microesferas y evaluar la estabilidad del FCE encapsulado con vistas al diseño de una formulación basada en este sistema de liberación modificada.

7 Referencias

1. Bilati U, Allémann E and Doelker E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 59:375-388.
2. Pisal DS, Kosloski MP and Balu-Iyer SV. Delivery of Therapeutic Proteins. *J Pharm Sci* 2010; 99:2557-2575.
3. Dai C, Wang B and Zhao H. Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2005; 41:117-120.
4. Johnson OL, Jaworowicz W, Cleland J, Bailey L, Charnis M, Duenas E and Wu C. The stabilization and encapsulation of human growth hormone into biodegradable microspheres. *Pharm Res* 1997; 14:730-735.
5. Jones AJ, Putney S, Johnson OL and Cleland J. Recombinant human growth hormone poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere formulation development. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 28:71-84.
6. Reddy KR. Controlled-release, pegylation, liposomal formulations: new mechanisms in the delivery of injectable drugs. *Ann Pharmacother* 2000; 34:915-923.
7. Giteau A, Venier-Julienne MC, Aubert-Pouëssel A and Benoit JP. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *Int J Pharm* 2008; 350:14-26.
8. vanderWalle CF, Sharma G and Kumar R. Current approaches to stabilising and analysing proteins during microencapsulation in PLGA. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6:177-186.
9. Freiberg S and Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm* 2004; 282:1-18.
10. Li M, Rouaud O and Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm* 2008; 363:26-39.
11. López-Saura P. What is interferon good for? Ten years of experience in Cuba. *Biotechnol Apl* 1992; 9:207-227.
12. Davis F. The origin of peganology. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54:457-458.
13. Ramon J, Castro F, Sáez V, Páez R and Fernández E. Dendrimer-like polymer structure which is used to obtain conjugates of pharmaceutical interest. 2006; WO 2007/062610.
14. Ramon J, Saez V, Baez R, Aldana R and Hardy E. PEGylated Interferon-alpha2b: A branched 40K polyethylene glycol derivative. *Pharm Res* 2005; 22:1375-1387.
15. Allen TA. Liposomes. Opportunities in drug delivery. *Drugs* 1997; 54:8-14.
16. Freitas S, Merkle HP and Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release* 2005; 102:313-332.
17. Pestka S, Krause CD and Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004; 202:8-32.
18. Isaacs A and Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957; 147:258-267.

19. Cantell K, Hirvonen S, Mogensen KE and Pyhala L. Human leukocyte interferon: production, purification, stability, and animal experiments. In Waymouth C (ed.), *The production and use of interferon for the treatment and prevention of human virus infections*, Tissue Culture Association, Rockville, MD, USA, 1974, pp. 35-38.
20. Lemieux R, Neron S and Proulx C. Method of producing human IFN-alpha using sendai virus-infected hematopoietic stem cells. 2002; US 6 472 208.
21. Walter MR, Bordens R, Nagabhushan TL, Williams BR, Herberman RB, Dinarello CA, Borden EC, Trotta PP, Pestka S and Pfeffer LM. Review of recent developments in the molecular characterization of recombinant alfa interferons on the 40th anniversary of the discovery of interferon. *Cancer Biother Radiopharm* 1998; 13:143-154.
22. Garmendia G, Miranda N, Borroso S, Longchong M, Martinez E, Ferrero J, Porrero P and Lopez-Saura P. Regression of infancy hemangiomas with recombinant IFN-alpha 2b. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21:31-38.
23. Nodarse-Cuni H, Iznaga-Marin N, Viera-Alvarez D, Rodriguez-Gomez H, Fernandez-Fernandez H, Blanco-Lopez Y, Viada-Gonzalez C, López-Saura P and Papillomatosis CGftSoLiRR. Interferon alpha-2b as adjuvant treatment of recurrent respiratory papillomatosis in Cuba: National Programme(1994-1999 report). *J Laryngol Otol* 2004; 118:681-687.
24. REUTERS BUSINESS INSIGHT. HEALTHCARE. The Therapeutic Proteins Outlook To 2007: An analysis of leading products and late-stage pipeline developments. www.leaddiscovery.co.uk/reports/rbhc0103t.pdf (accessed Abril 1, 2004).
25. Garcia-Garcia I, Gonzalez-Delgado CA, Valenzuela-Silva C, Hernandez-Bernal F, Ferrero-Bibilonia J, Soto-Hernandez R, Cervantes-Llano M, Duconge J, Correa-Fernandez A, Olivera-Ruano L and Lopez-Saura P. Bioequivalence of two recombinant interferon alpha-2b liquid formulations in healthy male volunteers. *Drugs R D* 2004; 5:271-280.
26. Ruiz L, Reyes N, Duany L, Franco A, Aroche K and Hardy E. Long-term stabilization of recombinant human interferon α 2b in aqueous solution without serum albumin. *Int J Pharm* 2003; 264:57-72.
27. Santana H, Martínez E, Sánchez JC, Moya G, Sosa R, Hardy E, Beldarraín A, Huerta V, González LJ, Betancourt L, Besada V, Brito R, Currás T, Ferrero J, Pujols V, Gil M and Herrera L. Molecular characterization of recombinant human interferon alpha-2b produced in Cuba. *Biotechnol Apl* 1999; 16:154-159.
28. García-García I, González-Delgado CA, Valenzuela-Silva CM, Díaz-Machado A, Cruz-Díaz M, Nodarse-Cuní H, Pérez-Pérez O, Bermúdez-Badell CH, Ferrero-Bibilonia J, Páez-Meireles R, Bello-Rivero I, Castro-Odio FR and López-Saura PA. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of two "pegylated" interferon alpha-2 formulations in healthy male volunteers: a randomized, crossover, double-blind study. *BMC Pharmacol* 2010; 10:15.
29. Carpenter G and Cohen S. Epidermal growth factor (EGF). *Ann Rev Biochem* 1979; 48:193-216.
30. Acosta JB, Savigne W, Valdez C, Franco N, Alba JS, Rio Ad, López-Saura P, Guillén G, Lopez E, Herrera L and Fernández-Montequin J. Epidermal growth factor intralesional infiltrations can prevent amputation in patients with advanced diabetic foot wounds. *Int Wound J* 2006; 3:232-239.

31. Berlanga J, Lodos J, Labarta V, Merino N, González T, Hayes O, Oramas P, Mulet J and López-Saura P. The effect of epidermal growth factor treatment schedule on the healing of full-thickness wounds in pigs. *Biotecnol Apl* 1997; 14:163-168.
32. Goodlad RA and Wright NA. Epidermal growth factor and transforming growth factor-[alpha] actions on the gut. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7:928-932.
33. Sullivan PB, Lewindon PJ, Cheng C, Lenehan PF, Kuo BS, Haskins JR, Goodlad RA, Wright NA and Iglesia FAdl. Intestinal mucosa remodeling by recombinant human epidermal growth factor(1-48) in neonates with severe necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2007; 42:462-469.
34. Caballero ME, Berlanga J, Ramirez D, Lopez-Saura P, Gozalez R, Floyd DN, Marchbank T and Playford RJ. Epidermal growth factor reduces multiorgan failure induced by thioacetamide. *Gut* 2001; 48:34-40.
35. Guglietta A and Sullivan PB. Clinical applications of epidermal growth factor. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7:945-950.
36. Berlanga J, Fernández-Montequin J, Valdés C, Franco N, Rojas I, Santana H, Chacon L, Guillen G, Herrera L, Canan-Haden L, Gerónimo H and Sotolongo J. Use of pharmaceutical composition containing epidermal growth factor (EGF) for preventing diabetic limb amputation. 2003; WO 03/053458.
37. González T. Progresos en las aplicaciones clínicas del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante en Cuba. *Biotecnol Apl* 1995; 12:180-181.
38. Aguilera A, García O, Rojas I, Berlanga J and Hardy E. Estudio de penetrabilidad y liberación del FCE a partir de diferentes formulaciones semisólidas. *Biotecnol Apl* 2001; 18:p. E49.
39. Berlanga J. Heberprot-P: antecedentes experimentales y bases farmacológicas. *Biotecnol Apl* 2010; 27:81-87.
40. Remuñán C and Alonso MJ. Microencapsulación de medicamentos. In Vilá-Jato JL (ed.), *Tecnología Farmacéutica Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*, Vol. I, Ed. Síntesis, S.A., Madrid, 1997, pp. 577-609.
41. Reed AM and Gilding PAR. Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/polylactic homo and copolymers 2. *In vitro* Degradation. *Polymer* 1981; 22:494-498.
42. Tamber H, Johansen P, Merkle HP and Gander B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57:357-376.
43. Sinha VR and Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release* 2003; 90:261-280.
44. Vert M, Mauduit J and Li S. Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity. *Biomaterials* 1994; 15:1209-1213.
45. Schoenhammer K, Boisclair J, Schuetz H, Petersen H and Goepferich A. Biocompatibility of an injectable in situ forming depot for peptide delivery. *J Pharm Sci* 2010; 99:4390-4399.
46. Eppley BL. Use of resorbable plates and screws in pediatric facial fractures. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:385-391.
47. Thomasin C, Johansen P, Alder R, Bemsel R, Hottinger G, Altorfer H, Wright AD, Wehrli E, Merkle HP and Gander B. A contribution to overcoming the problem of residual solvents in biodegradable microspheres prepared by coacervation. *Eur J Pharm Biopharm* 1996; 42:16-24.

48. Gander B, Wehrli E, Alder R and Merkle P. Quality improvement of spray-dried, protein loaded D,L-PLA microspheres by appropriate polymer solvent selection. *J Microencapsul* 1995; 12:83-97.
49. Johansen P, Merkle HP and Gander B. Technological considerations related to the up-scaling of protein microencapsulation by spray-drying. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50:413-417.
50. Yeo Y, Baek N and Park K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2001; 6:213-230.
51. Woo BH, Kostanski JW, Gebrekidan S, Dani BA, Thanoo BC and DeLuca PP. Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of 120-day poly(D,L-lactide) leuprolide microspheres. *J Control Release* 2001; 75:307-315.
52. Feng L, Qi XR, Zhou XJ, Maitani Y, Wang SC, Jiang Y and Nagai T. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres. *J Control Release* 2006; 112:35-42.
53. Goraltchouk A, Scanga V, Morshead CM and Shoichet MS. Incorporation of protein-eluting microspheres into biodegradable nerve guidance channels for controlled release. *J Control Release* 2006; 110:400-407.
54. Zhou S, Sun J, Sun L, Dai Y, Liu L, Li X, Wang J, Weng J, Jia W and Zhang Z. Preparation and characterization of interferon-loaded magnetic biodegradable microspheres. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 87:189-196.
55. Ho ML, Fu YC, Wang GJ, Chen HT, Chang JK, Tsai TH and Wang CK. Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite. *J Control Release* 2008; 128:142-148.
56. Kumar R and Palmieri MJ. Points to consider when establishing drug product specifications for parenteral microspheres. *AAPS J* 2010; 12:27-32.
57. Weert MV, Hennink WE and Jiskoot W. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharm Res* 2000; 17:1159-1167.
58. Péan JM, Venier-Julienne MC, Boury F, Menei P, Benoit D and Benoit JP. NGF release from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. Effect of some encapsulation parameters on encapsulated NGF stability. *J Control Release* 1998; 56:175-187.
59. Pistel KF, Bittner B, Koll H, Winter G and Kissel T. Biodegradable recombinant human erythropoietin loaded microspheres prepared from linear and star-branched block copolymers: Influence of encapsulation technique and polymer composition on particle characteristics. *J Control Release* 1999; 59:309-325.
60. Zhou S, Deng X, He S, Li X, Jia W, Wei D, Zhang Z and Ma J. Study on biodegradable microspheres containing recombinant interferon-alpha-2a. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54:1287-1292.
61. Cohen S, Yoshioka T, Lucarelli M, Hwang LH and Langer R. Controlled delivery systems for proteins based on poly (lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharm Res* 1991; 8:713-720.
62. Pérez C, Jesús PD and Griebenow K. Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method. *Int J Pharm* 2002; 248:193-206.

63. Herbert P, Murphy K, Johnson O, Dong N, Jaworowicz W, Tracy M, Cleland J and Putney S. A large-scale process to produce microencapsulated proteins. *Pharm Res* 1998; 15:357-361.
64. Tracy M. Development and scale-up of a microsphere protein delivery system. *Biotechnol Prog* 1998; 14:108-115.
65. Kim HK and Park TG. Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release. *J Control Release* 2004; 98:115-125.
66. Lam XM, Duenas ET, Daugherty AL, Levin N and Cleland JL. Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes. *J Control Release* 2000; 67:281-292.
67. Tan H and Ye J. Surface morphology and *in vitro* release performance of double-walled PLLA/PLGA microspheres entrapping a highly water-soluble drug. *Appl Surf Sci* 2008; 255:353-356.
68. Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V and Langer R. Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres. *Science* 1994; 263:1600-1603.
69. Fu K, Pack DW, Klibanov AM and Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res* 2000; 17:100-106.
70. Weert MV, Hof RV, Weerd JV, Heeren RMA, Posthuma G, Hennink WE and Crommelin DJA. Lysozyme distribution and conformation in a biodegradable polymer matrix as determined by FTIR techniques. *J Control Release* 2000; 68:31-40.
71. Mao S, Xu J, Cai C, Germershaus O, Schaper A and Kissel T. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres. *Int J Pharm* 2007; 334:137-148.
72. Rahman NA and Mathiowitz E. Localization of bovine serum albumin in double-walled microspheres. *J Control Release* 2004; 94:163-175.
73. Bitz C and Doelker E. Influence of the preparation method on residual solvents in biodegradable microspheres. *Int J Pharm* 1996; 131:171-181.
74. Meng FT, Ma GH, Qiu W and Su ZG. W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *J Control Release* 2003; 91:407-416.
75. Pistel KF and Kissel T. Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using W/O/W double emulsion technique. *J Microencapsul* 2000; 17:467-483.
76. Bernstein H, Mathiowitz E, Morrel E and Brickner A. Erythropoietin drug delivery system. 1993; WO 9 325 221.
77. Khan A, Tracy MA and Bernstein H. Composition and method for the controlled release of metal cation-stabilized interferon. 1998; US 5 711 968.
78. Alonso MJ, Gupta RK, Min C, Siber GR and Langer R. Biodegradable microspheres controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine* 1994; 12:299-312.
79. Haznedar S and Dortunc B. Preparation and *in vitro* evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide. *Int J Pharm* 2004; 269:131-140.

80. Sun SW, Jeong YI, Jung SW and Kim SH. Characterization of FITC-albumin encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres and its release characteristics. *J Microencapsul* 2003; 20:479-488.
81. Cheng YH, Illum L and Davis SS. A poly(d,l-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol. *J Control Release* 1998; 55:203-212.
82. Péan JM, Venier-Julienne MC, Filmon R, Sergent M, Phan-Tan-Luu R and Benoit JP. Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles. *Int J Pharm* 1998; 166:105-115.
83. Kempen DHR, Lu L, Zhu X, Kim C, Jabbari E, Dhert WJA, Currier BL and Yaszemski MJ. Development of biodegradable poly(propylene fumarate)/poly(lactic-co-glycolic acid) blend microspheres. I. Preparation and characterization. *J Biomed Mater Res Part A* 2004; 70A:283-292.
84. Dinarvand R, Moghadam SH, Mohammadyari-Fard L and Atyabi F. Preparation of biodegradable microspheres and matrix devices containing naltrexone. *AAPS PharmSciTech* 2003; 4:E34.
85. Lee SC, Oh JT, Jang MH and Chung SI. Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration. *J Control Release* 1999; 59:123-132.
86. Mateovic T, Kriznar B, Bogataj M and Mrhar A. The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres. *J Microencapsul* 2002; 19:29-36.
87. Burgess DJ, Crommelin DJA, Hussain AS, Chen M and EUFEPS. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report. *AAPS PharmSci* 2004; 6:article 11.
88. Sánchez A, Villamayor B, Guo Y, McIver J and Alonso MJ. Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Int J Pharm* 1999; 185:255-266.
89. Cleland JL. Solvent evaporation processes for the production of controlled release biodegradable microsphere formulations for therapeutics and vaccines. *Biotechnol Prog* 1998; 14:102-107.
90. Srinivasan C, Katare YK, Muthukumar T and Panda AK. Effect of additives on encapsulation efficiency, stability and bioactivity of entrapped lysozyme from biodegradable polymer particles. *J Microencapsul* 2005; 22:127-138.
91. ICH. Harmonised Tripartite Guideline on Impurities in New Drug Substances. (Q3A), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Geneva, Switzerland, 1997.
92. B'Hymer C. Residual Solvent Testing: A review of gas-chromatographic and alternative techniques. *Pharm Res* 2003; 20:337-344.
93. Larsen C, Larsen SW, H.Jensen, Yaghmur A and Ostergaard J. Role of in vitro release models in formulation development and quality control of parenteral depots. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6:1283-1295.
94. Allison SD. Analysis of initial burst in PLGA microparticles. *Expert Opin Drug Deliv* 2008; 5:615-628.

95. Blanco-Prieto J, Besseghir K, Orsolini P, Heimgartner F, Deuschel C, Merkle HP, Nam-Tran H and Gander B. Importance of the test medium for the release kinetics of a somatostatin analogue from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Int J Pharm* 1999; 184:243-250.
96. Yang J and Cleland JL. Factors affecting the *in vitro* release of recombinant human interferon- γ (rhIFN- γ) from PLGA microspheres. *J Pharm Sci* 1997; 86:908-914.
97. Crotts G, Sah H and Park TG. Adsorption determines *in-vitro* protein release rate from biodegradable microspheres: quantitative analysis of surface area during degradation. *J Control Release* 1997; 47:101-111.
98. Crotts G and Park TG. Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *J Control Release* 1997; 44:123-134.
99. Dani BA and DeLuca PP. Preparation, Characterization, and *In Vivo* Evaluation of Salmon Calcitonin Microspheres. *AAPS PharmSciTech* 2001; 2:article 22.
100. Johnson OL, Cleland JL, Lee HJ, Charnis M, Duenas E, Jaworowicz W, Shepard D, Shahzamani A, Jones AJ and Putney SD. A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone. *Nat Med* 1996; 2:795-799.
101. Kim HK and Park TG. Microencapsulation of human growth hormone within biodegradable polyester microspheres: Protein aggregation stability and incomplete release mechanism. *Biotechnol Bioeng* 1999; 65:661-667.
102. Park TG. Degradation of poly(-lactic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials* 1995; 16:1123-1130.
103. Ravivarapu HB, Burton K and DeLuca PP. Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50:263-270.
104. Yang YY, Chia HH and Chung TS. Effect of preparation temperature on the characteristics and release profile of PLGA containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation. *J Control Release* 2000; 69:81-96.
105. Capan Y, Jiang G, Giovagnoli S, Na KH and DeLuca PP. Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of human Growth Hormone. *AAPS PharmSciTech* 2003; 4:article 28.
106. Fu K, Griebenow K, Hsieh L, Klibanov AM and Langer R. FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres. *J Control Release* 1999; 58:357-366.
107. Yang TH, Dong A, Meyer J, Johnson OL, Cleland JL and Carpenter JF. Use of Infrared Spectroscopy to Assess Secondary Structure of Human Growth Hormone within Biodegradable Microspheres. *J Pharm Sci* 1999; 88:161-165.
108. Fu K, Klibanov AM and Langer R. Protein stability in controlled-release systems. *Nat Biotechnol* 2000; 18:24-25.
109. Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC and Schwendeman SP. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57:391-410.
110. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW and Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res* 2010; 27:544-575.

111. Haynes CA and Norde W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids Surfaces [B]: Biointerfaces* 1994; 2:517-566.
112. Norde W and Giacomelli C. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. *J Biotechnol* 2000; 79:259-268.
113. Norde W. My voyage of discovery to proteins in flatland . . .and beyond. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2008; 61:1-9.
114. Norde W. Energy and Entropy of Protein Adsorption. *J Dispersion Science and Technology* 1992; 13:363-377.
115. Cleland JL and Jones AJ. Stable Formulations of Recombinant Human Growth Hormone and Interferon- γ for Microencapsulation in Biodegradable Microspheres. *Pharm Res* 1996; 13:1464-1475.
116. Pérez-Rodríguez C, Montano N, Gonzalez K and Griebenow K. Stabilization of α -chymotrypsin at the CH_2Cl_2 / water interface and upon water-in-oil-in-water encapsulation in PLGA microspheres. *J Control Release* 2003; 89:71-85.
117. Perez C and Griebenow K. Improved activity and stability of lysozyme at the water/ CH_2Cl_2 interface: enzyme unfolding and aggregation and its prevention by polyols. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53:1217-1226.
118. Sah H. Protein behavior at the water/methylene chloride interface. *J Pharm Sci* 1999; 88:1320-1325.
119. Vaidya SS and Ofoli RY. Adsorption and interaction of fibronectin and human serum albumin at the liquid-liquid interface. *Langmuir* 2005; 21:5852-5858.
120. Tobio M, Schwendeman SP, Guo Y, McIver J and Langer R. Improved immunogenicity of a core-coated tetanus toxoid delivery system. *Vaccine* 2000; 18:618-622.
121. Bouissou C, Potter U, Altroff H, Mardon H and Walle CFvd. Controlled release of the fibronectin central cell binding domain from polymeric microspheres. *J Control Release* 2004; 95:557-566.
122. Rosa GD, Iommelli R, Rotonda MIL, Miro A and Quaglia F. Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres. *J Control Release* 2000; 69:283-295.
123. Wei G, Lu LF and Lu WY. Stabilization of recombinant human growth hormone against emulsification-induced aggregation by Pluronic surfactants during microencapsulation. *Int J Pharm* 2007; 338:125-132.
124. Castellanos IJ, Al-Azzam W and Griebenow K. Effect of the covalent modification with poly(ethylene glycol)- on alpha-chymotrypsin stability upon encapsulation in poly(lactic-co-glycolic) microspheres. *J Pharm Sci* 2005; 94:327-340.
125. Daly SM, Przybycien TM and Tilton RD. Adsorption of poly(ethylene glycol)-modified ribonuclease A to a poly(lactide-co-glycolide) surface. *Biotechnol Bioeng* 2005; 90:856-868.
126. Diwan M and Park TG. Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres. *J Control Release* 2001; 73:233-244.
127. Diwan M and Park TG. Stabilization of recombinant interferon-alpha by pegylation for encapsulation in PLGA microspheres. *Int J Pharm* 2003; 252:111-122.

128. Kim TH, Lee H and Park TG. Pegylated recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) for sustained release from biodegradable PLGA microspheres. *Biomaterials* 2002; 23:2311-2317.
129. Krishnamurthy R, Lumpkin JA and Sridhar R. Inactivation of lysozyme by sonication under conditions relevant to microencapsulation. *Int J Pharm* 2000; 205:23-34.
130. De Leede LG, Humphries JE, Bechet AC, van Hoogdalem EJ, Verrijck R and Spencer DG. Novel controlled-release Lemna-derived IFN-alpha2b (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial. *J Interferon Cytokine Res* 2008; 28:113-122.
131. Sánchez A, Tobio M, Gonzalez L, Fabra A and Alonso MJ. Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. *Eur J Pharm Sci* 2003; 18:221-229.
132. Tabata Y and Ikada Y. Synthesis of gelatin microspheres containing interferon. *Pharm Res* 1989; 6:422-427.
133. Yang F, Song FL, Pan YF, Wang ZY, Yang YQ, Zhao YM, Liang SZ and Zhang YM. Preparation and characteristics of interferon-alpha poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *J Microencapsul* 2010; 27:133-141.
134. Yoshikawa Y, Komuta Y, Nishihara T, Itoh Y, Yoshikawa H and Takada K. Preparation and evaluation of once-a-day injectable microspheres of interferon alpha in rats. *J Drug Target* 1999; 6:449-461.
135. Zhang YM, Yang F, Yang YQ, Song FL and Xu AL. Recombinant interferon-alpha2b poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: pharmacokinetics-pharmacodynamics study in rhesus monkeys following intramuscular administration. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29:1370-1375.
136. Zheng CH, Yu HY, Gao JQ, Sun XY and Liang WQ. Hydrophilic biodegradable microspheres of interferon-alpha and its pharmacokinetics in mice. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 85:225-230.
137. Hua H, Jo JR, Yeon JH, Hong JT, Jung KH, Yoo SK and Jang BC. Preparation of Branched Dextran Microspheres of Soluble Interferon alpha and its Activity *In Vitro* and *In Vivo*. *J Microbiol Biotechnol* 2011; 21:176-182.
138. Li Z, Li L, Liua Y, Zhang H, Li X, Luo F and Mei X. Development of interferon alpha-2b microspheres with constant release. *Int J Pharm* 2011; 410:48-53.
139. Han K, Lee KD, Gao ZG and Park JS. Preparation and evaluation of poly(L-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. *J Control Release* 2001; 75:259-269.
140. Dong X, Xu J, Wang W, Luo H, Liang X, Zhang L, Wang H, Wang P and Chang J. Repair effect of diabetic ulcers with recombinant human epidermal growth factor loaded by sustained-release microspheres. *Sci China C Life Sci* 2008; 51:1039-1044.
141. Schwarz K and Epple M. A detailed characterization of polyglycolide prepared by solid state polycondensation reaction. *Macromol Chem Phys* 1999; 200:2221-2229.
142. Huang HW, Mohan SK and Yu C. The NMR solution structure of human epidermal growth factor (hEGF) at physiological pH and its interactions with suramin. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402:705-710.

143. Santana H, Espino Y, Franco A, Furrázola G and Hardy E. A sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of recombinant human interferon α -2b. *Biotech Tech* 1999; 13:341-346.
144. Martínez M, Currás T, Pérez E, Acosta A, Rojas I, Almazán M, Moya G and Pérez LC. Control analítico y especificaciones de calidad del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante usado como materia prima activa en formulaciones farmacéuticas. *Biotechnol Apl* 1994; 11:78-82.
145. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
146. Ferrero J, Ochagavía ME, Aguilera A and López-Saura P. Interferon antiviral activity titration using the "SUMA" device system. *Biotechnol Apl* 1994; 11:34-42.
147. Cleland JL, Lim A, Barrón L, Duenas ET and Powell MF. Development of a single-shot subunit vaccine for HIV-1: Part 4. Optimizing microencapsulation and pulsatile release of MN rgp 120 from biodegradable microspheres. *J Control Release* 1997; 47:135-150.
148. Wischke C and Borchert HH. Influence of the primary emulsification procedure on the characteristics of small protein-loaded PLGA microparticles for antigen delivery. *J Microencapsul* 2006; 23:435-448.
149. Al-haushey L, Bolzinger MA, Bordes C, Gauvrit JY and Briancon S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. *Int J Pharm* 2007; 344:16-25.
150. Parikh RH, Parikh JR, Dubey RR, Soni HN and Kapadia KN. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing 5-Fluorouracil: Optimization of process parameters. *AAPS PharmSciTech* 2003; 4:Article 13.
151. Xie SY, Wang SL, Zhao BK, Han C, Wang M and Zhou WZ. Effect of PLGA as a polymeric emulsifier on preparation of hydrophilic protein-loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2008; 67:199-204.
152. Chung TW, Tsai YL, Hsieh JH and Tsai WJ. Different ratios of lactide and glycolide in PLGA affect the surface property and protein delivery characteristics of the PLGA microspheres with hydrophobic additives. *J Microencapsul* 2006; 23:15-27.
153. Yeo Y and Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res* 2004; 27:1-12.
154. Rafferty JL, Zhang L, Siepmann JI and Schure MR. Retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: a molecular perspective. *Anal Chem* 2007; 79:6551-6558.
155. Besada V, Antuch W, Rodríguez R, González L, Chinaea G and Padrón G. Mass spectrometry in protein analysis. *Biotechnol Apl* 1992; 9:1-15.
156. Padrón G, Besada V, Agraz A, Quiñones Y, Herrera L, Shimonishi Y and Takao T. Mass spectrometric analysis of recombinant human α -2 interferon. *Analytica Chimica Acta* 1989; 223:361-369.
157. Jiang G, Woo BH, Kang F, Singh J and DeLuca PP. Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release* 2002; 79:137-145.

158. Park TG, Lee HY and Nam YS. A new preparation method for protein loaded poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres and protein release mechanism study. *J Control Release* 1998; 55:181-191.
159. Park TG. Degradation of poly(-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *J Control Release* 1994; 30:161-173.
160. Husmann M, Schenderlein S, Lück M, Lindner H and Kleinebudde P. Polymer erosion in PLGA microparticles produced by phase separation method. *Int J Pharm* 2002; 242:277-280.
161. Spenlehauer G, Vert M, Benoit JP and Boddaert A. *In vitro* and *in vivo* degradation of poly(D,L-lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method. *Biomaterials* 1989; 10:557-563.
162. Nguyen CN, Christensen JM and Ayres JW. Formulation of Sustained-Release Verapamil HCl and Diltiazem HCl Semisolid Matrix Capsules. *Pharmaceutical Development and Technology* 2008; 13:115-125.
163. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker EM, Buri P and Peppas NA. Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm* 1983; 15:25-35.
164. Costa P and Sousa-Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 2001; 13:123-133.
165. Ritger PL and Peppas NA. A Simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J Control Release* 1987; 5:23-36.
166. Lee S, Kim MS, Kim JS, Park HJ, Woo JS, Lee BC and Hwang SJ. Controlled delivery of a hydrophilic drug from a biodegradable microsphere system by supercritical anti-solvent precipitation technique. *J Microencapsul* 2006; 23:741-749.
167. Singhvi G and Singh M. Review: *In-vitro* drug release characterization models. *Int J Pharm Studies and Res* 2011; II:77-84.
168. Brazel C and Peppas NA. Modeling of drug release from swellable polymers. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 49:47-58.
169. Siepmann J and Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 48:139-157.
170. Kang F, Jiang G, Hinderliter A, DeLuca PP and Singh J. Lysozyme stability in primary emulsion for PLGA microsphere preparation: effect of recovery methods and stabilizing excipients. *Pharm Res* 2002; 19:629-633.
171. Harris JM and Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:214-221.
172. DeSantis G and Jones JB. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10:324-330.
173. Zhou Q, Jiang X, Li K and Fan X. Synthesis, characterization and *in situ* intestinal absorption of different molecular weight scutellarin-PEG conjugates. *Pharmazie* 2006; 61:660-663.
174. Crotts G and Park TG. Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. *J Microencapsul* 1998; 15:699-713.

175. Lin SY, Chen KS, Teng HH and Li MJ. *In vitro* degradation and dissolution behaviours of microspheres prepared by three low molecular weight polyesters. *J Microencapsul* 2000; 17:577-586.
176. She E, Kipper MJ, Dziadul B, Lim M-K and Narasimhan B. Mechanistic relationships between polymer microstructure and drug release kinetics in bioerodible polyanhydrides. *J Control Release* 2002; 82:115-125.
177. Izumikawa S, Yoshioka S, Aso Y and Takeda Y. Preparation of poly(l-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate. *J Control Release* 1991; 15:133-140.
178. Varder NK and Pack DW. Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4:35-51.
179. Tracy MA, Ward KL, Firouzabadian L, Wang Y, Dong N, Qian R and Zhang Y. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres *in vivo* and *in vitro*. *Biomaterials* 1999; 20:1057-1062.
180. Gaspar MM, Blanco D, Cruz ME and Alonso MJ. Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and *in vitro* release. *J Control Release* 1998; 52:53-62.
181. Paillard-Giteau A, Tran VT, Thomas O, Garric X, Coudane J, Marchal S, Chourpa I, Benoît JP, Montero-Menei CN and Venier-Julienne MC. Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an s/o/w emulsion technique. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 75:128-136.
182. Putney SD and Burke P. Improving protein therapeutics with sustained-release formulation. *Nat Biotechnol* 1998; 16:153-157.
183. Burgess DJ, Hussain AS, Ingallinera TS and Chen M. Assuring Quality and Performance of Sustained and Controlled Release Parenterals: AAPS Workshop Report, Co-Sponsored by FDA and USP. *Pharm Res* 2002; 19:1761-1768.
184. USP30/NF25. Sterility tests <71>. 2007.

Anexos

Anexo 1: Ajuste de los perfiles de liberación de IFN- α 2b y FCE a distintos modelos

Los datos de los perfiles de liberación del IFN- α 2b y el FCE utilizados para este estudio se muestran en la Tabla A1.1.

Tabla A1.1. Porcentaje de la proteína liberado en el tiempo.

Tiempo (días)	IFN- α 2b	FCE
0	0	0
0,0035	-	34,2
0,042	-	40,2
0,0625	4,1	-
0,125	10,1	-
0,25	12,5	-
0,33	-	41,6
0,67	-	43,6
1	15,1	45,2
2	16,1	50,2
3	17,4	52,0
4	-	54,5
7	17,8	57,3

Ajuste a la Cinética Mixta de Beren-Hopfenberg

Los datos de la Tabla A1.1 fueron ajustados a la ecuación:

$$C(\%) = k_1 \cdot t + k_2 \cdot t^{1/2}$$

mediante el programa GraphPad Prism (San Diego California USA). En la Tabla A1.2 se muestra los datos del análisis tal como son reportados por el programa.

Tabla A1.2 Ajuste a la Cinética Mixta de Beren-Hopfenberg.

	IFN- α 2b	FCE
Valores del mejor ajuste		
k_1	-5,318	-17,33
k_2	20,35	64,60
Error estándar		
k_1	1,008	6,167
k_2	2,183	12,95
Intervalo de confianza (95%)		
k_1	-7,784 a -2,853	-31,74 a -3,113
k_2	15,01 a 25,69	34,74 a 94,47
Bondad del ajuste		
Grados de libertad	6	8
R^2	0,8804	0,1662
Suma de cuadrados	35,70	2000
$Sy.x$	2,439	15,81
Test de rachas		
Puntos por encima de la curva	4	5
Puntos por debajo de la curva	3	4
Número de corridas	4	3
p	0,5429	0,0238
Desviación del modelo	No significativa	Significativa
Datos		
Número de valores de x	8	10
Número de réplicas de y	1	1
Total de valores de y	8	10
Valores de y omitidos	0	0

Parte II. Ajuste a la ecuación empírica de Korsmeyer – Peppas

Los datos de la Tabla A3.1 fueron ajustados a la ecuación:

$$C(\%) = k_p \cdot t^n$$

mediante el software GraphPad Prism (San Diego California USA). En la Tabla A1.3 se muestra los datos del análisis tal como son reportados por el programa.

Tabla A1.3 Ajuste a la ecuación empírica de Korsmeyer – Peppas

	IFN- α 2b	FCE
Valores del mejor ajuste		
k_p	13,65	47,85
n	0,1849	0,07009
Error estándar		
k_p	0,8390	0,7545
n	0,04126	0,008302
Intervalo de confianza (95%)		
k_p	11,60 a 15,71	46,11 a 49,59
n	0,08390 a 0,2858	0,05095 a 0,08923
Bondad del ajuste		
Grados de libertad	6	8
R^2	0,9095	0,9835
Suma de cuadrados	27,01	39,57
$Sy.x$	2,122	2,224
Test de rachas		
Puntos por encima de la curva	5	5
Puntos por debajo de la curva	2	4
Número de corridas	3	3
p	0,3333	0,0714
Desviación del modelo	No significativa	No significativa
Datos		
Número de valores de x	7	8
Número de réplicas de y	1	1
Total de valores de y	7	8
Valores de y omitidos	0	0

Criterio de información de Akaike

Se utilizó este criterio para corroborar que el modelo que mejor reproduce el comportamiento experimental es el de Korsmeyer-Peppas. En la Tabla A1.4 aparecen los resultados de la comparación de los modelos para el IFN- α 2b y el FCE.

Tabla A1.4 Comparación de los modelos para los datos del IFN- α 2b y el FCE según el criterio de información de Akaike.

	IFN- α 2b	FCE
Modelo más sencillo	Korsmeyer-Peppas	Korsmeyer-Peppas
Probabilidad de que sea correcto (%)	75,32	>99,99
Modelo alternativo	Cinética mixta	Cinética mixta
Probabilidad de que sea correcto (%)	24,68	<0,01
Razón de las probabilidades	3,05	-
Modelo Preferido	Korsmeyer-Peppas	Korsmeyer-Peppas
Diferencia en el Akaike	-2,232	-39,23

Anexo 2: Cálculo del área superficial hidrofóbica a partir de los valores determinados para los modelos estructurales del FCE de 51 aa y el FCE de 52aa

Con la ayuda del “WHAT IF Web Interface” (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>) se construyeron los modelos para las especies de 52 y 51 aa y se calculó el área superficial para los diferentes tipos de átomos. A partir de estos datos se calcularon los promedios y el área superficial hidrofóbica e hidrofílica. Las imágenes de la estructura tridimensional de ambas moléculas y la distribución de superficie hidrofílica e hidrofóbica fueron obtenidas mediante el programa UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, EE.UU., <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). En las Tablas A2.1 y A2.2 aparecen los valores del área superficial asociada a los distintos átomos del esqueleto de la molécula y de sus cadenas laterales calculadas de los 10 modelos construidos para el FCE de 51 y 52 aa respectivamente.

Tabla A2.1 Área (expresada en Å²) de la superficie del FCE de 51 aa asociada a los distintos átomos del esqueleto y de las cadenas laterales. N: nitrógeno, Ca: carbono alfa, C: carbono, O: oxígeno, S: azufre.

Átomos	Modelo										Promedio	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Esqueleto	N	23,38	24	31,02	28,37	22,6	29,61	29,15	27,28	22,91	33,2	27,15
	Ca	61,86	47,53	55,39	58,54	58,01	53,3	51,37	52,95	56,27	47,53	54,28
	C	20,44	17,3	18,7	21,32	20,1	20,27	20,1	24,99	25,51	17,82	20,66
	O	116,28	120,61	116,49	108,35	119,66	106,55	123,57	126,11	117,76	116,28	117,17
Cadena lateral	N	144,02	119,71	131,55	126,41	139,66	127,03	128,12	142,77	131,86	147,76	133,89
	C	635,71	594,47	597,27	603,21	640,61	608,28	619,11	585,74	640,61	652,14	617,72
	O	175,48	165,33	174,95	157,19	181,29	183,4	175,58	178,44	180,87	174	174,65
	S	12,73	24,59	17,26	28,26	10,36	22,22	18,77	12,94	19,42	24,59	19,11

Tabla A2.2 Área (expresada en Å²) de la superficie del FCE de 52 aa asociada a los distintos átomos del esqueleto y de las cadenas laterales. N: nitrógeno, Ca: carbono alfa, C: carbono, O: oxígeno, S: azufre.

Átomos	Modelo										Promedio	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Esqueleto	N	23,38	24,00	31,02	28,37	22,60	29,61	29,15	27,28	22,91	33,20	27,15
	Ca	62,91	48,05	55,74	59,59	59,06	54,34	52,25	54,00	57,32	48,40	55,17
	C	19,92	14,15	17,82	20,27	17,12	17,12	17,82	21,49	22,02	15,55	18,33
	O	118,60	120,82	118,39	110,04	121,25	107,08	123,78	125,05	117,65	117,55	118,02
Cadena lateral	N	143,71	117,68	131,55	126,41	139,66	127,03	128,12	142,77	131,86	147,76	133,66
	C	655,11	617,02	617,54	624,18	665,07	631,00	641,31	608,28	665,94	673,46	639,89
	O	175,48	165,22	174,95	157,19	181,29	183,40	175,58	178,44	180,87	174,00	174,64
	S	12,73	24,59	17,26	28,26	10,36	22,22	18,77	12,94	19,42	24,59	19,11

Se tomó como área superficial hidrofóbica (*SH*) a la suma de las áreas promedio asociadas a los átomos de carbono del esqueleto y de las cadenas laterales de las moléculas. De modo que:

$$SH_{51} = 54,28 \text{ \AA}^2 + 20,66 \text{ \AA}^2 + 617,72 \text{ \AA}^2$$

$$SH_{52} = 55,17 \text{ \AA}^2 + 18,33 \text{ \AA}^2 + 639,89 \text{ \AA}^2$$

$$SH_{51} = 692,66 \text{ \AA}^2$$

$$SH_{52} = 713,39 \text{ \AA}^2$$

Anexo 3: Selección de la fase acuosa del sistema de extracción para la caracterización del IFN- α 2b encapsulado. Análisis estadístico

Se prepararon 4 réplicas independientes de las muestras que fueron cuantificadas por duplicado por microBCA y ELISA. Los valores calculado aparecen en las Tablas A3.1 y A3.2.

Tabla A3.1. Concentración de IFN- α 2b mediante el ensayo de MicroBCA en mezclas de la proteína con las diferentes fases de extracción.

Aditivos		Concentración de IFN- α 2b (mg/mL)							
		-	SDS	Tritón X-100	NP-40	Tween 20	Tween 80	Pluronic F-68	Pluronic F-127
Réplicas	1	1,12	1,20	1,45	1,53	1,48	1,55	1,32	1,37
	2	1,13	1,17	1,45	1,50	1,50	1,59	1,29	1,35
	3	1,19	1,18	1,43	1,30	1,34	1,40	1,27	1,19
	4	1,14	1,19	1,41	1,32	1,37	1,39	1,25	1,20
	5	1,00	1,16	1,42	1,42	1,48	1,51	1,39	1,38
	6	1,03	1,04	1,39	1,38	1,45	1,55	1,36	1,35
	7	0,98	0,89	1,36	1,20	1,16	1,19	1,01	1,14
	8	0,92	0,89	1,30	1,32	1,16	1,19	0,98	1,19
Media		1,06	1,10	1,40	1,40	1,40	1,40	1,20	1,30
D. E.		0,09	0,10	0,05	0,10	0,10	0,20	0,20	0,10

Tabla A3.2. Concentración de IFN- α 2b mediante el ELISA en mezclas de la proteína con las diferentes fases de extracción.

Aditivos		Concentración de IFN- α 2b (mg/mL)							
		-	SDS	Tritón X-100	NP-40	Tween 20	Tween 80	Pluronic F-68	Pluronic F-127
Réplicas	1	1,12	1,24	1,56	1,59	1,78	1,66	1,57	1,46
	2	1,23	1,32	1,69	1,55	1,83	1,60	1,55	1,41
	3	1,10	1,20	1,50	1,65	1,83	1,68	1,47	1,39
	4	1,12	1,23	1,66	1,67	1,77	1,61	1,60	1,43
	5	1,32	1,39	1,90	1,73	1,88	1,89	1,70	1,47
	6	1,48	1,61	1,97	1,86	1,88	1,97	1,63	1,75
	7	1,20	1,46	1,79	2,02	1,71	1,89	1,58	1,73
	8	1,36	1,45	1,89	1,92	1,93	1,94	1,70	1,66
Media		1,20	1,40	1,80	1,80	1,83	1,80	1,60	1,50
D, E,		0,10	0,10	0,20	0,20	0,07	0,20	0,08	0,20

Los datos experimentales fueron evaluados mediante un análisis de varianza el cual arrojó que la probabilidad de la prueba F es inferior a 0,05, por lo que hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos estudiados para un nivel de confianza del 95,0%. La comparación de las muestras por pares se realizó mediante la prueba de Intervalos Múltiples de Duncan. En las Tablas A3.3 y A3.4 aparecen definidos los grupos para los cuales no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores promedio de la concentración del IFN- α 2b.

Tabla A3.3. Grupos homogéneos de Duncan para las medias muestrales de la concentración de IFN- α 2b determinada por el ensayo de microBCA.

Grupo experimental	IFN- α 2b (μ g/mL)	Grupos homogéneos
PBS	1,06	X
PBS + SDS	1,09	X
PBS + Pluronic F-68	1,23	X
PBS + Pluronic F-127	1,27	X X
PBS + Tween 20	1,37	X X
PBS + NP-40	1,37	X X
PBS + Tritón X-100	1,40	X X
PBS + Tween 80	1,42	X

Tabla A3.4. Grupos homogéneos de Duncan para las medias muestrales de la concentración de IFN- α 2b determinada por el ELISA.

Grupo experimental	IFN- α 2b (μ g/mL)	Grupos homogéneos
PBS	1,24	X
PBS + SDS	1,36	X
PBS + Pluronic F-127	1,54	X
PBS + Pluronic F-68	1,60	X
PBS + Tritón X-100	1,74	X
PBS + NP-40	1,75	X
PBS + Tween 80	1,78	X
PBS + Tween 20	1,83	X

Como puede observarse en las tablas anteriores, sólo la muestra que contiene SDS no mostró diferencias significativas con la muestra de referencia para la cuantificación mediante microBCA y ELISA. Por esta razón se puede decir que el SDS al 0,1% presente en la fase acuosa del sistema de extracción no introduce cambios en la cuantificación del IFN- α 2b por microBCA y ELISA.

Anexo 4: Selección de la fase acuosa del sistema de extracción para la caracterización del FCE encapsulado. Análisis estadístico

Se prepararon 4 réplicas independientes de las muestras que fueron cuantificadas por duplicado por microBCA y ELISA. Los valores calculado aparecen en las Tablas A4.1 y A4.2.

Tabla A4.1. Concentración de FCE mediante el ensayo de MicroBCA en mezclas de la proteína con las diferentes fases de extracción.

Aditivos		Concentración de FCE (mg/mL)							
		-	SDS	Tritón X-100	NP-40	Tween 20	Tween 80	Pluronic F-68	Pluronic F-127
Réplicas	1	0,83	0,91	1,05	1,09	1,10	1,06	1,01	1,02
	2	0,85	0,88	1,02	1,04	1,10	1,48	1,21	1,11
	3	0,86	0,90	0,96	0,94	1,14	1,05	1,03	1,08
	4	0,81	0,84	1,08	1,03	1,13	1,17	1,25	1,14
	5	0,78	0,99	0,99	1,11	0,92	0,96	0,67	0,91
	6	0,80	0,95	0,93	1,07	0,92	1,19	0,66	0,88
	7	0,73	0,87	0,94	1,13	0,94	1,00	0,69	0,93
	8	0,61	0,87	0,95	1,12	0,92	1,02	0,72	0,92
Media		0,78	0,90	0,99	1,07	1,00	1,10	0,90	1,00
D. E.		0,08	0,05	0,06	0,06	0,10	0,20	0,30	0,10

Tabla A4.2. Concentración de FCE mediante el ELISA en mezclas de la proteína con las diferentes fases de extracción.

Aditivos		Concentración de FCE (mg/mL)							
		-	SDS	Tritón X-100	NP-40	Tween 20	Tween 80	Pluronic F-68	Pluronic F-127
Réplicas	1	1,00	1,09	1,09	1,17	1,02	1,02	1,04	0,83
	2	1,01	1,09	1,06	1,09	1,05	1,07	1,08	0,86
	3	1,09	1,00	1,00	0,99	1,13	0,99	1,00	0,93
	4	1,10	0,99	1,01	1,00	1,25	0,98	1,03	0,97
	5	0,99	1,10	1,12	1,10	0,99	1,00	1,03	0,85
	6	1,00	1,03	1,16	1,17	1,06	1,09	1,09	0,86
	7	1,02	1,07	0,96	0,97	1,03	0,99	0,98	1,00
	8	1,04	1,01	0,98	1,06	1,09	1,06	1,00	1,00
Media		1,03	1,05	1,05	1,07	1,08	1,03	1,03	0,91
D. E.		0,04	0,04	0,07	0,08	0,08	0,04	0,04	0,07

El análisis de varianza realizado permitió determinar la probabilidad de la prueba F la cual fue inferior a 0,05, por lo que hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 8 variables, para los dos ensayos utilizados, a un nivel de confianza del 95,0%. Seguidamente se realizó la prueba de Intervalos Múltiples de Duncan para determinar las diferencias entre los pares de grupos experimentales. En las Tablas A4.3 y A4.4 aparecen definidos los grupos para los cuales no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores promedio de la concentración del FCE.

Tabla A4.3. Grupos homogéneos de Duncan para las medias muestrales de la concentración de FCE determinada por el ensayo de microBCA.

Grupo experimental	FCE (µg/mL)	Grupos homogéneos
PBS	0,78	X
PBS + SDS	0,90	X X
PBS + Pluronic F-68	0,90	X X
PBS + Tritón X-100	0,99	X X
PBS + Pluronic F-127	1,00	X X
PBS + Tween 20	1,02	X X
PBS + NP-40	1,07	X
PBS + Tween 80	1,12	X

Tabla A4.4. Grupos homogéneos de Duncan para las medias muestrales de la concentración de FCE determinada por el ELISA.

Grupo experimental	FCE (µg/mL)	Grupos homogéneos
PBS + Pluronic F-127	0,91	X
PBS + Pluronic F-68	1,02	X
PBS + Tween 80	1,03	X
PBS	1,03	X
PBS + Tritón X-100	1,05	X
PBS + SDS	1,05	X
PBS + NP-40	1,07	X
PBS + Tween 20	1,08	X

De estos resultados puede afirmarse que el FCE puede ser cuantificado adecuadamente por microBCA independientemente de la presencia de SDS o Pluronic F-68 al 0,1% en dicha muestra; y que la cuantificación por ELISA de esta proteína no se afecta por la presencia de los tensoactivos evaluados a excepción del Pluronic F-127.

Anexo 5. Evaluación de otras propiedades que deben tener las microesferas para ser incluidas en un producto biofarmacéutico

I) Humedad residual

La presencia de agua en las partículas puede provocar que ocurran fenómenos indeseables tales como cambios en la matriz polimérica por la hidrólisis de los enlaces éster del polímero, o cambios en la proteína favorecidos por el medio húmedo. Por esta razón resulta importante determinar la humedad residual en las microesferas.

Este parámetro se determinó por el método de Karl-Fisher (63). Se utilizaron de 20 mg microesferas, las cuales fueron transvasadas directamente al recipiente de valoración del equipo. La determinación se realizó según se describe en la USP 32.

La humedad residual fue, como promedio, menor que 2,5%. Dicho valor resulta adecuado si se tiene en cuenta que para la mayor parte de las formulaciones liofilizadas de proteínas el límite de aceptación para este parámetro es de 5%. Por otra parte, para las microesferas de PLGA cargadas con hormona de crecimiento humana, desarrolladas a escala de laboratorio, se reportó un valor similar ($1,7 \pm 0,7\%$) (63).

II) Solvente residual

Los solventes residuales en formas farmacéuticas se definen como productos químicos orgánicos volátiles que se utilizan o se producen en la fabricación de medicamentos y excipientes. Debido a la toxicidad de estas sustancias, debe evitarse su presencia en cualquier medicamento. Sin embargo en la mayoría de los casos resulta imposible eliminarlos totalmente durante los procesos tecnológicos de producción, por lo tanto deben ser cuantificados como parte del control de calidad de las formulaciones y su contenido debe ser inferior al límite establecido por las agencias reguladoras (91, 92, 183).

El solvente residual se determinó mediante cromatografía gaseosa. Se pesaron 10 mg de microesferas y se disolvieron en 1 mL de dioxano. La solución fue analizada en un equipo PYE UNICAM PU 4550 (Pye Unicam, Reino Unido) con integrador Shimadzu C-R3A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Como fase estacionaria se utilizó Porapak P en una columna de 2,1 m de largo por 4 mm de diámetro interno. La fase móvil (gas portador) utilizada fue nitrógeno, a un flujo de 30 mL/min. Se empleó un detector por ionización de llama con un flujo de hidrógeno de 33 mL/min y un flujo de aire de 300 mL/min. El volumen de inyección fue 10 μ L. El gradiente de temperatura utilizado fue de 120°C a 210°C, con una velocidad de incremento de 10°C/min. La temperatura del inyector fue de 230°C al

igual que la del detector. Se determinó primero, de forma independiente, el tiempo de retención del DCM (analito) y del dioxano (disolvente).

Para determinar los restos de DCM (único solvente empleado durante el proceso de microencapsulación), las muestras de microesferas se disolvieron en dioxano. Un cromatograma de este solvente se muestra en la Figura A5.1 (A) y en él se observa una señal principal con un tiempo de retención de 9,112 minutos. Al analizar una muestra de DCM disuelto en dioxano aparece otra señal con un tiempo de retención de 4,093 minutos que se asigna a dicho solvente (Figura A5.1 (B)).

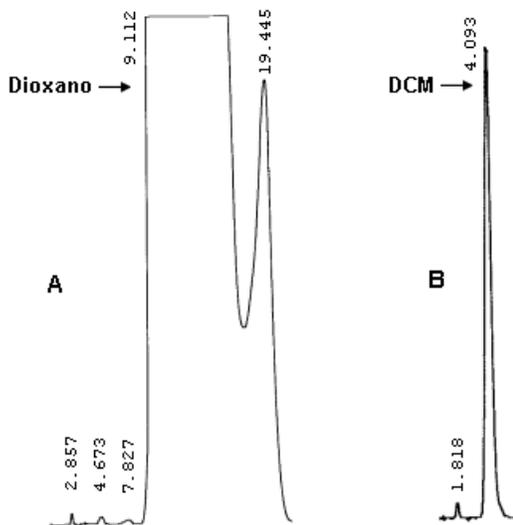


Figura A5.1. Cromatogramas correspondientes al dioxano (A) y al diclorometano (B).

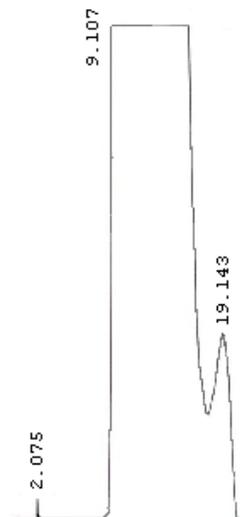


Figura A5.2. Cromatograma de microesferas disueltas en dioxano.

Posteriormente, se analizaron 8 muestras de microesferas elaboradas en días diferentes. Los cromatogramas obtenidos fueron iguales y en ninguno apareció señal en el tiempo de retención correspondiente al DCM. La Figura A5.2 muestra uno de estos cromatogramas.

Para comprobar la efectividad de la técnica empleada para la detección de DCM a bajas concentraciones en las muestras, se tomaron tres preparaciones de microesferas disueltas en dioxano y se les adicionó una cantidad de DCM conocida: 10, 20 y 40 ppm respectivamente. En los tres cromatogramas apareció la señal correspondiente al DCM, y aunque la misma es pequeña, es posible observar que aumenta de tamaño según aumenta la concentración de DCM presente en la muestra (Figura A5.3). De acuerdo con estos resultados, es posible afirmar que el contenido de DCM en la solución de microesferas fue menor que 10 ppm que es la concentración mínima de DCM detectada,

mientras que la concentración de DCM en las microesferas sólidas es menor que 1000 ppm de acuerdo con la dilución que se realiza al preparar las muestras (se disuelven 10 mg de microesferas en 1 mL de dioxano).

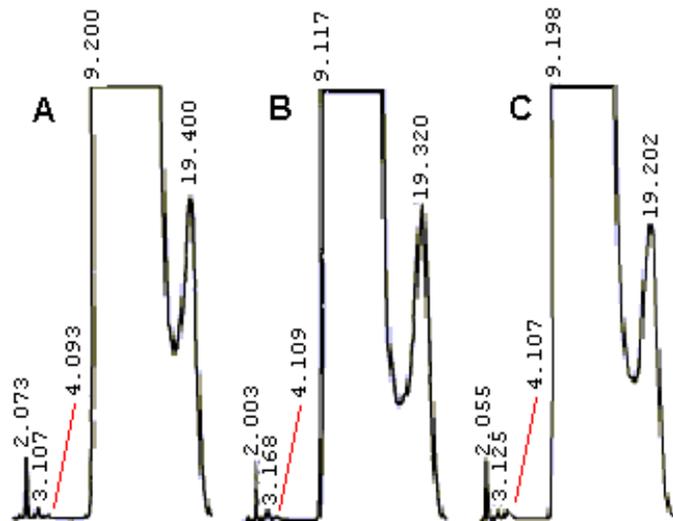


Figura A5.3. Cromatogramas de muestras de microesferas disueltas con adición de diclorometano a diferentes concentraciones. A) 10 ppm, B) 20 ppm y C) 40 ppm.

La dosis diaria permitida de DCM es de 6 mg (91). A partir del resultado anterior, se puede afirmar que las microesferas obtenidas presentan una cantidad de DCM residual menor que 1000 μg por cada gramo de microesferas ($\mu\text{g/g}$ o ppm), o lo que es lo mismo menor que 1 mg/g. Es decir, que sería posible administrar 6 g de microesferas para alcanzar el límite permisible de DCM. Como las dosis que se requieren de estos principios activos son pequeñas (generalmente microgramos), las cantidades de microesferas que se administran no suelen exceder los 100 mg. Si consideramos que se administrarán 100 mg de microesferas en una dosis estaremos introduciendo en el organismo como máximo 0,1 mg de DCM. Esta cantidad resulta mucho menor que la dosis diaria permitida (6 mg).

III) Esterilidad de las microesferas

Las microesferas no pueden ser esterilizadas por los métodos tradicionales tales como filtración, irradiación o vapor, por esto se requiere diseñar un procedimiento de encapsulación en condiciones asépticas que garanticen la esterilidad del producto final (87, 183). En este trabajo el procedimiento de encapsulación fue adaptado para cumplir este propósito.

Todos los reactivos empleados como materias primas o intermediarios fueron esterilizados de forma apropiada antes de ser usados. Los solventes fueron esterilizados mediante filtración por membrana de teflón de 0,2 μm . La solución de PVA al 1% se esterilizó mediante autoclave (121°C, 1 atm) durante 30 min. Los recipientes, otros materiales y las partes móviles de los equipos que se ponen en contacto con las soluciones, emulsiones o microesferas fueron esterilizados también en la autoclave con las condiciones mencionadas anteriormente.

Todas las operaciones d el proceso de encapsulación fueron realizadas en un flujo laminar según se muestra en la Figura A5.4.



Figura A5.4. Las operaciones del proceso de encapsulación por el método de doble emulsión - evaporación del disolvente se llevan a cabo en un flujo laminar para garantizare la esterilidad de las microesferas obtenidas.

La esterilidad de las microesferas se evalúa mediante el examen de este parámetro en las partículas formadas (esterilidad externa) y además en el interior de las partículas (esterilidad interna). La esterilidad externa se estudia mediante el método de siembra directa descrito en la USP 30 (184). Para ello se incubaron las partículas en los dos medios de cultivo utilizados en las condiciones adecuadas y se analizó la presencia de crecimiento microbiano durante 14 días. La esterilidad interna se estudió mediante el método de filtración por membrana (184). Para ello 10 mg de microesferas se disolvieron en 1 mL de dimetilsulfóxido y la solución obtenida se filtró a través de una membrana de teflón de 0,2

μm debidamente esterilizada. El filtrado se incubó con los medios de cultivo recomendados y el crecimiento microbiano fue observado durante 14 días.

Varios lotes experimentales de microesferas fueron analizados por este procedimiento y no se observó crecimiento microbiano en ninguna de las muestras evaluadas. Este resultado permite afirmar que es posible obtener, por el procedimiento de doble emulsión - evaporación del disolvente realizado en condiciones asépticas, microesferas cargadas con IFN- α 2b y FCE estériles.