ARTÍCULO

Propuesta biotecnológica para el tratamiento del cáncer de cérvix uterino, empleando liposomas

Rosalva Rangel-Corona[1], Ramón Soto-Vázquez[1], Benito Weiss-Steider[1], María Esther Gil-Alegre[2*], María Teresa Corona-Ortega[1*]

[1]FES-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). [2]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (UCM)
*e-mail: megil@ucm.es, tcvaldes05@yahoo.com.mx

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 1 (2014), pág. 179-191

RESUMEN

Los nanotransportadores de fármacos son una excelente opción para formar sistemas farmacéuticos eficientes y seguros. Interleucina 2 (IL-2) es eficaz en la terapia antitumoral, sin embargo su administración sistémica se ha limitado por su alta toxicidad. En el presente trabajo se aborda la investigación en animales del tratamiento antitumoral con IL-2 transportada en liposomas frente a IL-2 libre, y se aborda un paso imprescindible para el futuro uso de los liposomas con IL-2 como terapia biotecnológica para pacientes con carcinoma de cérvix: los primeros estudios de estabilidad farmacéutica.

Palabras clave: Interleucina 2; Liposomas; Estabilidad.

ABSTRACT

Biotechnological proposal for cervical cancer treatment using liposomes.

Drug nanosystems are an excellent option to form efficient and safe pharmaceutical systems. Our team has developed methodology based on the use of Interleukin 2 (IL-2) which has proven very effective in antitumor therapy, but systemic administration is limited by its high toxicity. The present work discusses in vivo evaluation of the tumor using IL-2 carried in liposomes against IL-2 free, and also addresses an important and necessary step for the future use of IL-2 liposomes in biotechnology therapy for patients with carcinoma of the cervix: the early pharmaceutical stability studies.

Keywords: Interleukin 2; Liposomes; Stability.

1. INTRODUCCIÓN

Los liposomas son nanotransportadores constituidos por bicapas concéntricas de lípidos anfipáticos separadas por un compartimiento acuoso. Los liposomas se forman cuando los lípidos anfipáticos se dispersan en agua y las partes hidrofóbicas de estas moléculas se acomodan en bicapas para liberarse del agua, dejando compartimientos acuosos en el interior y exterior. En la parte acuosa se pueden transportar diversas moléculas hidrofílicas de diferente naturaleza como ácidos nucleicos, fármacos inorgánicos, citocinas, antígenos o anticuerpos. Si el material que se desea transportar son moléculas hidrofóbicas, estas pueden ser incluidas dentro de las bicapas lipídicas del liposoma. Es importante mencionar que el número de bicapas lipídicas concéntricas, la composición de lípidos, la carga eléctrica de estos y la vía de administración pueden ser variadas para favorecer que los liposomas lleguen al lugar del organismo deseado (órgano, tejido, célula…).

Las sustancias encapsuladas en liposomas pueden ser administradas in vivo por diferentes vías de acuerdo a la diana deseada. Existe la posibilidad de llegar al sitio deseado modificando a los liposomas para no ser ingeridos por los macrófagos; sin embargo, si la diana son los macrófagos, existe una muy alta probabilidad de que las sustancias encapsuladas en liposomas entren en ellos y modifiquen su función. Con este enfoque, se ha avanzado mucho en la vehiculización de fármacos optimizando la vía de administración y la dosis necesaria. De hecho, los liposomas se han convertido en herramientas de gran utilidad, debido a que garantizan que pequeñas concentraciones de cualquier sustancia lleguen al blanco adecuado reduciendo la toxicidad o efectos colaterales causados por el paso de las sustancias por el torrente sanguíneo. En la actualidad estas partículas han sido ampliamente utilizadas en una diversidad de aplicaciones; tales como vehículos para la transfección de material genético, liberadores de fármacos en sitios específicos y como modelos de diferentes tipos de membranas biológicas normales y transformadas (1).

Nuestro grupo de trabajo empezó utilizando liposomas para activar exitosamente a macrófagos con diferentes citocinas y evaluando la viabilidad tecnológica de este modelo utilizando la curva S de Gompertz (2). Posteriormente, se investigó in vivo la posibilidad de usar estos nanotransportadores para la liberación de una citocina inmunorreguladora, evitando que los liposomas pudieran ser fagocitados. Consecuencia de estos trabajos, se ha elegido, caracterizado y patentado (3-4) una formulación de liposomas que no es reconocida por los macrófagos y que además es capaz de transportar una molécula inmunorreguladora muy eficaz: el factor estimulador de linfocitos llamado Interleucina 2 (IL-2).

La IL-2 ha sido aprobada por la FDA como fármaco efectivo para la terapia de tumores humanos por su activación del sistema inmunológico, en particular de

los linfocitos T citotóxicos y de las células asesinas (5). Sin embargo, su administración vía sistémica se ha limitado debido a su alta toxicidad (6). Por esta razón se han buscado diversos métodos para liberar IL-2 a los tumores in situ, tal es el caso del uso de diversos tipos de liposomas (7); además estas partículas se han diseñado buscando su afinidad a las membranas de las células tumorales (8), ya sea llevando la IL-2 en su interior o unida covalentemente al exterior buscando su unión a las células diana (9-11).

Recientemente se ha descrito que diversas células tumorales poseen receptores funcionales para IL-2 (IL-2R), lo que ha convertido a este receptor en un blanco potencial para inmunoterapia (12). En este sentido, nuestro equipo ha informado de la presencia del receptor funcional para IL-2 en diversas líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino provenientes de pacientes mexicanas (13); así como del uso de nanotransportadores con IL-2 para la reducción de tumores de células humanas inducidos en ratones (14).

Los buenos resultados obtenidos en estos estudios han llevado al equipo a abordar un proyecto internacional con el objetivo final de alcanzar una terapia biotecnológica para pacientes con carcinoma de cerviz uterino, mediante la investigación y el desarrollo de un medicamento basado en liposomas con IL-2.

En el presente trabajo se aborda la investigación en animales del tratamiento antitumoral de IL-2 transportada en liposomas frente a IL-2 libre. Para ello, se emplean los liposomas con IL-2 diseñados y desarrollados por el equipo y se evalúa su capacidad para vectorizar a tumores de cáncer cérvico-uterino por la presencia del receptor funcional para IL-2 en los mismos.

En el presente trabajo también se aborda un paso importante y necesario para el uso futuro de nuestro sistema nanotransportador como terapia biotecnológica para pacientes con carcinoma de cérvix: los primeros estudios de estabilidad farmacéutica con fines de preformulación del medicamento biotecnológico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de liposomas con IL-2

Los liposomas transportadores de IL-2 objeto del trabajo son liposomas catiónicos, fabricados utilizando Espermidil-Colesterol (Esp-CH), un lípido catiónico que aunque es sintético, sus componentes están presentes en la naturaleza y se ha comprobado que no es citotóxico (15).

Para la preparación de los liposomas catiónicos se usó una mezcla que contenía el lípido catiónico Espermidil-Colesterol (Esp-CH) (sintetizado por el Dr. Miguel Ibáñez, México DF) y Fosfatidilcolina (PC) (Sigma Chemical, USA) usando

una relación molar 1:1. La mezcla de lípidos (10μmol) fue disuelta en cloroformo, el disolvente fue evaporado utilizando un flujo de nitrógeno a presión reducida, los liposomas se formaron por la hidratación de la película de lípidos en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (liposomas vacíos) o con IL-2 (R&D Systems, USA) (100 UI/mL) en PBS (liposomas con IL-2) mediante tres ciclos de sonicación (sonicador Lab Supply G112SOI) de 5 segundos separados por períodos de descanso de 30 segundos. Los liposomas formados fueron lavados por sedimentación a 200.000g durante 40 minutos en PBS, y después fueron resuspendidos en PBS.

2.2 Aspecto de los liposomas con IL-2: Microscopía electrónica

Para determinar la morfología y tamaño de nuestro sistema transportador se recurrió a la microscopía electrónica. Los liposomas con IL-2 se colocaron en rejillas de cobre con 200 mallas que estaban cubiertas con Formvar, se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y después se eliminó el líquido por decantación con papel filtro. Posteriormente, las muestras se tiñeron con una solución acuosa de acetato de uranilo al 4% durante 5 minutos, se eliminó el exceso de líquido y se dejaron secar durante 24 horas.

2.3. Evaluación in vivo, en animales de experimentación

2.3.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembra de la cepa CBA/ca de 18 a 24 meses de edad. Se mantuvieron en cajas especiales con ambiente controlado (esterilidad y 21ºC), en grupos de cuatro, y se les suministró alimento y agua ad libitum, según los protocolos aprobados por la Comisión de Ética para animales de experimentación de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México), la cual cumple con los códigos para el cuidado y uso de animales de experimentación.

2.3.2. Inducción de tumores en ratones

Para el modelo de inducción de tumores y evaluación del efecto biológico de los liposomas con IL-2 obtenidos se utilizó la técnica desarrollada por Rangel et al. (14). Brevemente, se utilizaron ratones singénicos de la cepa CBA, se inmunodeprimieron utilizando hidrocortisona, se les inyectaron las células tumorales de la línea INBL, se continuó la inmunodepresión en un tiempo total de seis semanas. Asumiendo que cada tumor es similar a una esfera, se calculó la masa tumoral de cada uno con la fórmula $4/3\ \pi r^3$ y se sumó la masa tumoral total. Además se evaluaron los efectos adversos visibles generados por la masa tumoral.

2.3.3. Evaluación del efecto de los liposomas con IL-2 sobre el tamaño de la masa tumoral.

Una vez inducidos los tumores en los ratones y determinado su tamaño inicial, se establecieron 3 grupos:

-grupo control

-grupo tratado con IL-2

-grupo tratado con liposomas transportadores de IL-2

El tratamiento se aplicó diariamente, durante 5 días, después de los cuales se sacrificó a los animales y se realizó una inspección minuciosa. Se cuantificaron los tumores, se extrajeron y se calculó la masa tumoral total.

2.3.4. Evaluación del efecto protector de los liposomas con IL-2 frente a los posibles efectos adversos causados por IL-2 libre (no transportada)

Se emplean los mismos grupos de ratones del estudio anterior. Después de sacrificarles, se realiza una inspección minuciosa para evaluar los posibles efectos adversos visibles derivados del tumor (grupo control), del tratamiento con IL-2 libre y del tratamiento con IL-2 transportado en liposomas.

2.3.5. Evaluación del efecto de los liposomas con IL-2 sobre las células tumorales.

Para la observación de los posibles cambios morfológicos de las células de los tumores inducidos en los ratones, debido al tratamiento con liposomas con IL-2, se sacrificaron, lotes de ratones después de una y dos horas de la administración de los liposomas con IL-2. Los tumores extraídos de los ratones sacrificados fueron fijados con glutaraldehído al 2.5% durante 1 hora y postfijados con solución Osmio-Milloning al 1% durante 1 hora. Las muestras fueron deshidratadas y embebidas en Epon® para proceder a cortar secciones finas de los tumores que se colocan en rejillas de cobre recubiertas con Formvar y se contrastan con citrato de plomo para su evaluación por microscopía electrónica de transmisión (microscopio electrónico JEOL-JEM-1010, JEOL USA, Inc., MA, USA).

2.4 Estudios de estabilidad física de los liposomas en el marco de la preformulación del medicamento biotecnológico.

Para la evaluación de la estabilidad física de los liposomas, se procedió a realizar la medición inicial de su tamaño y su complejidad en el citómetro de flujo (16), para después analizar sus posibles cambios físicos debidos a la exposición a diferentes causas de inestabilidad durante un determinado periodo de tiempo.

Los cambios en el tamaño y la complejidad de los liposomas se determinaron mediante la evaluación de las diferencias entre los histogramas obtenidos en la citometría para el tamaño y la conformación de los liposomas recién preparados y tras el almacenamiento. Se utilizó la estadística de Kolmogorov-Smirnove (K-S), de forma que, un valor de D (Diferencia) de 0 indicaría un total solapamiento y por tanto una total igualdad de los histogramas, y un valor de 1 indicaría que ningún punto está en concordancia, por lo que los histogramas serían totalmente diferentes. Para establecer la existencia de una

diferencia significativa en el tamaño o complejidad de los liposomas, el valor de D debe ser mayor a 0,5.

2.4.1. Fotosensibilidad

El estudio de fotoestabilidad se llevó a cabo siguiendo normativa ICH (17). Se tomaron muestras cada 15 minutos durante 45 minutos, a fin de detectar si se producían cambios significativos en conformación y tamaño de los liposomas, mediante citometría de flujo.

2.4.2. Efecto del pH

Con la finalidad de determinar el efecto del pH del medio sobre la estabilidad del sistema farmacéutico, se colocaron diferentes muestras en diferentes soluciones acuosas amortiguadoras con un intervalo de valores de pH comprendido entre 4 y 10. Las muestras se evaluaron después de una hora por citometría de flujo para detectar si se producían cambios significativos en la conformación y tamaño de los liposomas.

2.4.3. Efecto de la temperatura

A fin de observar el efecto de la temperatura sobre el sistema farmacéutico, los liposomas fueron sometidos a 3 temperaturas diferentes, en estufas de estabilidad estandarizadas (18), realizando un muestreo semanal durante un periodo de 5 semanas, para su evaluación por comparación con las especificaciones iniciales de complejidad y tamaño.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aspecto de los liposomas con IL-2: Microscopía electrónica.

La tinción negativa del sistema nanotransportador observada al microscopio electrónico (Figura 1) muestra liposomas con tamaños comprendidos entre 30 y 80 nm.

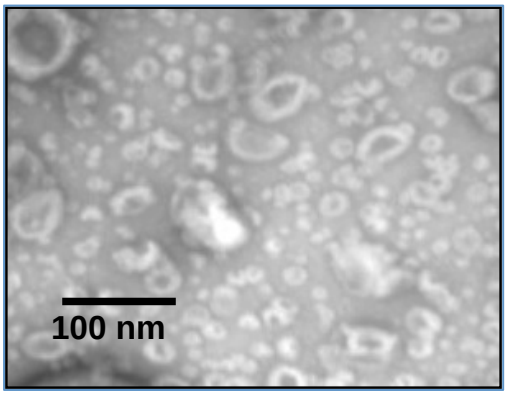


Figura 1.- Fotografía de los liposomas IL-2 (microscopio electrónico).

3.2. Inducción de tumores en ratones

Se inyectaron células de la línea INBL a un grupo de ratones inmunodeprimidos y después de 20 días fueron sacrificados, encontrando masas tumorales con una suma total en promedio de 20 mm^3. Por tanto, se establece que 20 días es el tiempo suficiente para tener un modelo animal de utilidad para la evaluación in vivo del tratamiento biotecnológico basado en los liposomas con IL-2.

Este modelo será de utilidad para la evaluación de la estabilidad biológica del medicamento biotecnológico basado en los liposomas con IL-2.

3.3. Evaluación in vivo del efecto de los liposomas con IL-2 sobre el tamaño de la masa tumoral.

Los resultados obtenidos en los tres grupos de ratones (grupo control, grupo tratado con IL-2 libre y grupo tratado con IL-2 transportada en los liposomas) indican un promedio de masa tumoral total de 20,5 mm^3 para los ratones control, 2 mm^3 para los tratados con IL-2 en el sistema nanotransportador y 3 mm^3 para los tratados con IL-2 libre. La total ausencia de tumores en algunos ratones y el pequeño tamaño de los existentes en otros ratones indican el fuerte efecto de la IL-2 ya sea libre o transportada en liposomas.

Cabe señalar que aunque la IL-2 libre es igualmente eficiente que la IL-2 nanotransportada para la reducción del crecimiento tumoral, los efectos adversos causados por la citocina libre, como son la inflamación y el goteo capilar, no se observan en los ratones tratados con la citocina transportada en los liposomas (Figura 2).

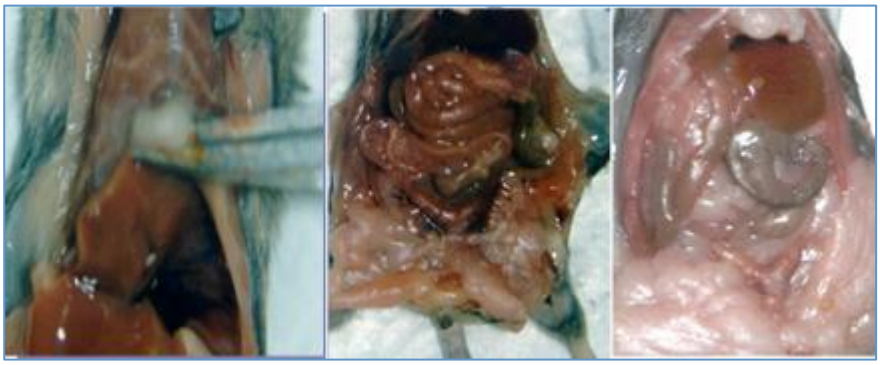
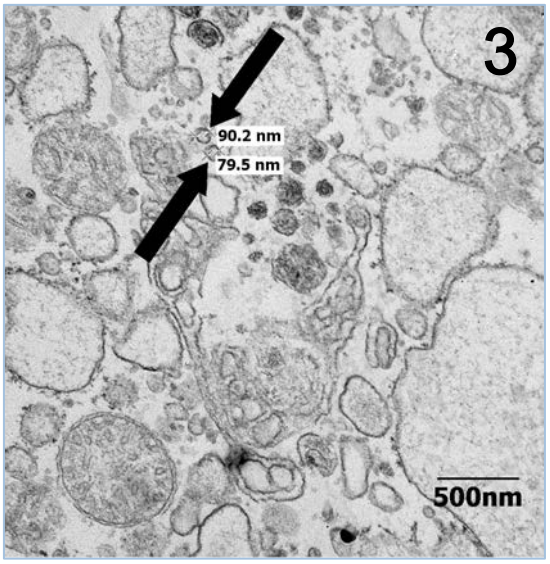


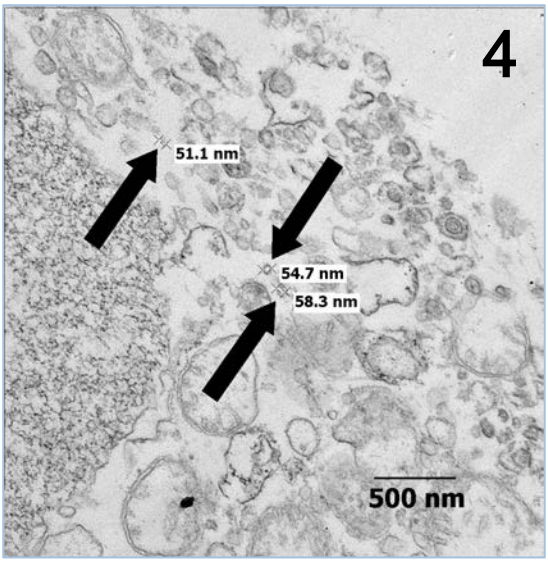
Figura 2.- Comparación de efectos adversos usando: Vehículo (a), IL-2 libre (b) y encapsulada en liposomas (c).

3.5. Evaluación del efecto de los liposomas con IL-2 sobre las células tumorales.

Para evaluar los posibles cambios en los tumores después de administrarles los liposomas con IL-2, se extrajeron tumores una y dos horas después del tratamiento. Se procedió a fijarlos, postfijarlos, deshidratarlos, incluirlos en resina, cortarlos, contrastarlos y observarlos con un microscopio electrónico. Los

resultados indican la posible presencia de los liposomas en la masa tumoral (Figuras 3 y 4).





Figuras 3 y 4.- Microscopía electrónica de tumores. Microfotografías que muestran la posible presencia de nuestras partículas dentro de los tumores tratados.

Es necesario destacar que tan sólo una hora después de la administración de los liposomas con IL-2, las células tumorales empiezan a sufrir daños severos perdiendo la integridad de sus membranas (Figuras 5 y 6).

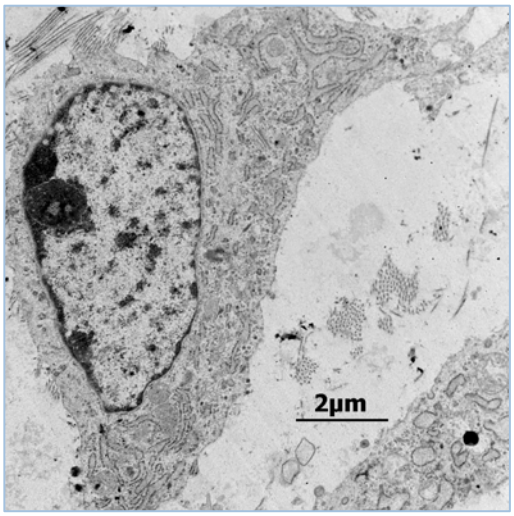


Figura 5.- Microscopía electrónica de tumores. Microfotografía que muestra una célula tumoral no tratada con liposomas con IL-2.

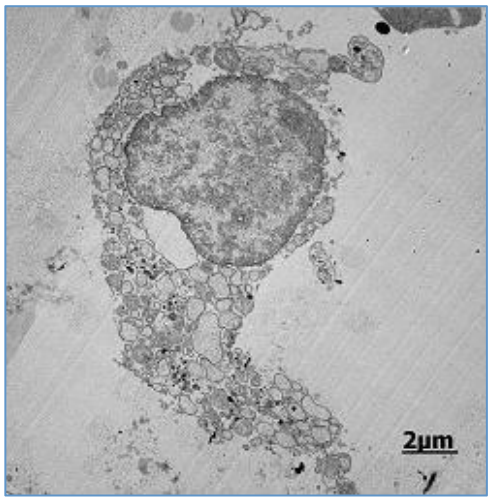


Figura 6.- Microscopía electrónica de tumores. Microfotografía que muestra una célula tumoral tratada con liposomas con IL-2.

3.6. Estudios de estabilidad física de los liposomas en el marco de la preformulación del medicamento biotecnológico.

La estabilidad física de los liposomas se evaluó determinando por citometría de flujo su tamaño y complejidad iniciales, de tal forma que se tenga un referente para comparar los posibles cambios en tamaño, debido al posible reacomodo de las bicapas, al hinchamiento/lisis, y comparar los posibles cambios de complejidad debidos a la conglomeración de las partículas.

Los resultados de comparación de histogramas obtenidos indican que el sistema farmacéutico no es sensible a la luz (Figura 7), que existe solo un pH de máxima estabilidad (Figura 8) y que existen dos temperaturas de máxima estabilidad (Figura 9). Cabe aclarar que no se mencionan los valores de pH y de temperatura de máxima estabilidad porque la estabilidad y la formulación de los liposomas con IL-2 diseñados y desarrollados por el equipo de investigación se encuentran en fase de desarrollo tecnológico para la obtención de la patente de formulación.

Este modelo de evaluación de la estabilidad física de los liposomas con IL-2 será de utilidad para la evaluación de la compatibilidad de dichos liposomas con sus posibles vehículos, constituyentes del medicamento biotecnológico final.

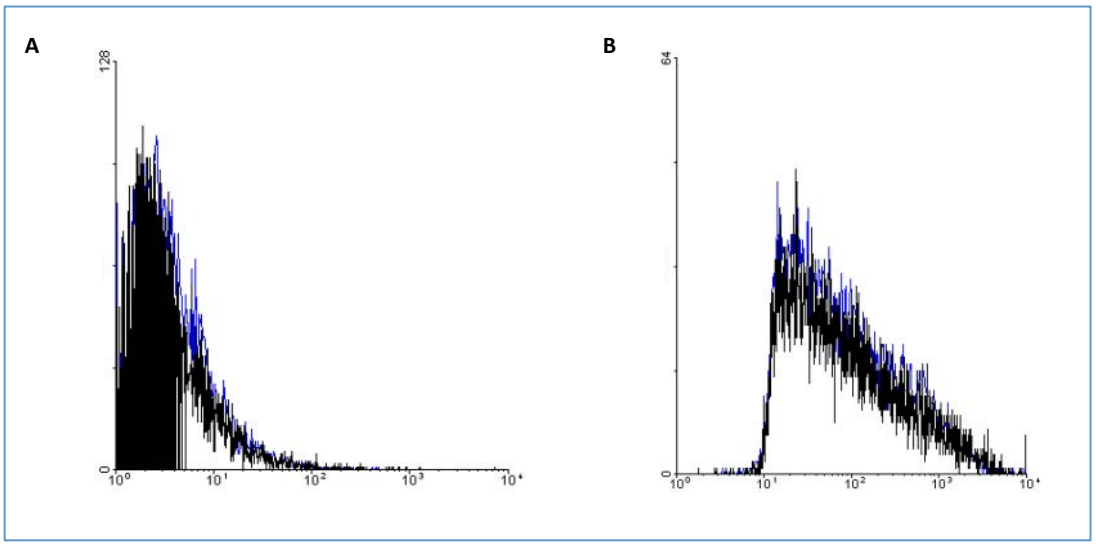


Figura 7.- Estudio de fotoestabilidad: comparación de histogramas tras 45 minutos de exposición. A) Complejidad (SSC-A), B) Tamaño (FSC-A). Se realizó la sobreposición del histograma control (azul) y el histograma de cada condición (negro) y se realizo la prueba estadística K –S para establecer que no existen diferencias significativas.

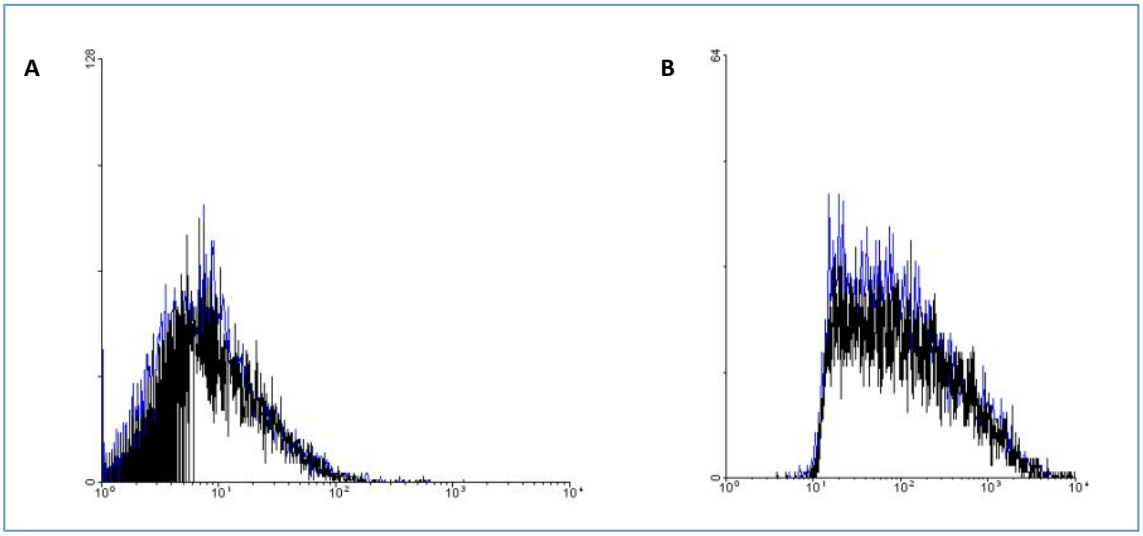


Figura 8.- Comparación de histogramas para el único pH que no mostró diferencia significativa con la conformación inicial. A) Complejidad (SSC-A), B) Tamaño (FSC-A). Se realizo la sobreposición del histograma control (azul) y el histograma de cada condición (negro) y se realizo la prueba estadística K –S para establecer que no existen diferencias significativas.

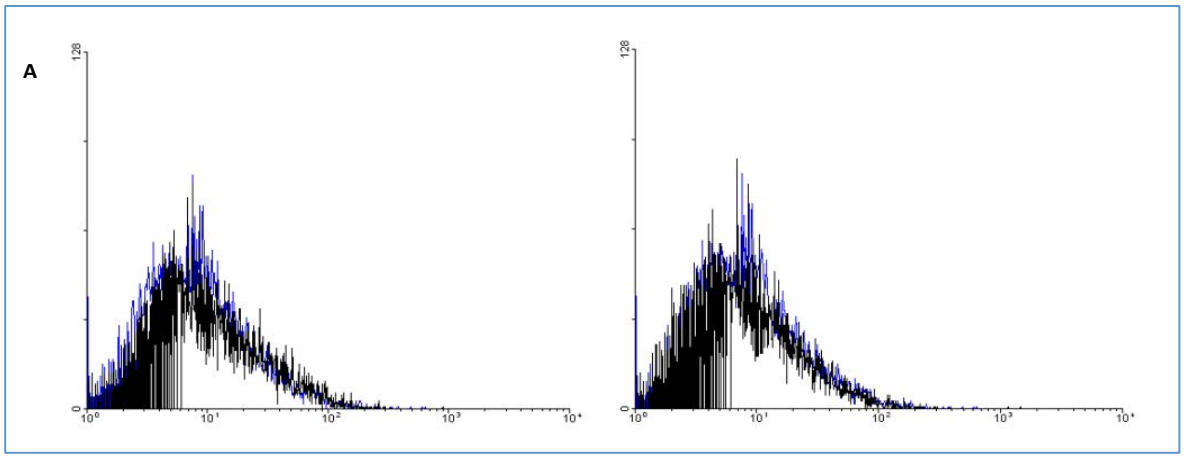


Figura 9.- Comparación de histogramas para dos temperaturas que no mostraron diferencia significativa con la conformación inicial. A) Complejidad (SSC-A), B) Tamaño (FSC-A). Se realizo la sobreposición del histograma control (azul) y el histograma de cada condición (negro) y se realizo la prueba estadística K –S para establecer que no existen diferencias significativas.

4. CONCLUSIONES

Recientemente, diferentes partículas liposomales han sido diseñadas a fin de transportar moléculas con actividad biológica. IL-2 es un potente estimulador inmune que podría ser liberado en el sitio tumoral por liposomas con el fin de ayudar al organismo a montar una respuesta inmune antitumoral mediante la activación de células asesinas.

Los linfocitos presentan receptores para la IL-2 y es mediante esta citocina que se activan a células citotóxicas o asesinas, por lo que se esperaría que la IL-2 trasportada por los liposomas los active convirtiéndolos en células asesinas. De esta manera se podrían diseñar estrategias para que estos vectores liposomales puedan transportar las dosis necesarias de la molécula de IL-2 in situ y tener una posible actividad terapéutica, sin los fuertes efectos tóxicos que se producen en el organismo cuando IL-2 libre es administrada a las dosis necesarias para un efecto terapéutico vía sistémica.

La línea celular de cáncer cérvico uterino INBL tiene la característica particular de expresar el receptor para IL-2 como los linfocitos y células NK. La razón por la cual estas células epiteliales expresan un receptor típico de linfocitos es desconocida; sin embargo, creemos que representa una oportunidad para intervención en la respuesta inmune. La razón de construir liposomas que puedan presentar moléculas de IL-2 en su superficie es no solo para favorecer que se unan a células del sistema inmunológico que tienen un receptor para este factor, sino que también esperaríamos que puedan servir como un puente de unión simultánea a las células tumorales ya que también presentan el receptor y de está forma al

tener a las células inmunocompetentes y a las tumorales en cercana proximidad se podría promover la activación del sistema inmune contra el tumor (Figura 10).

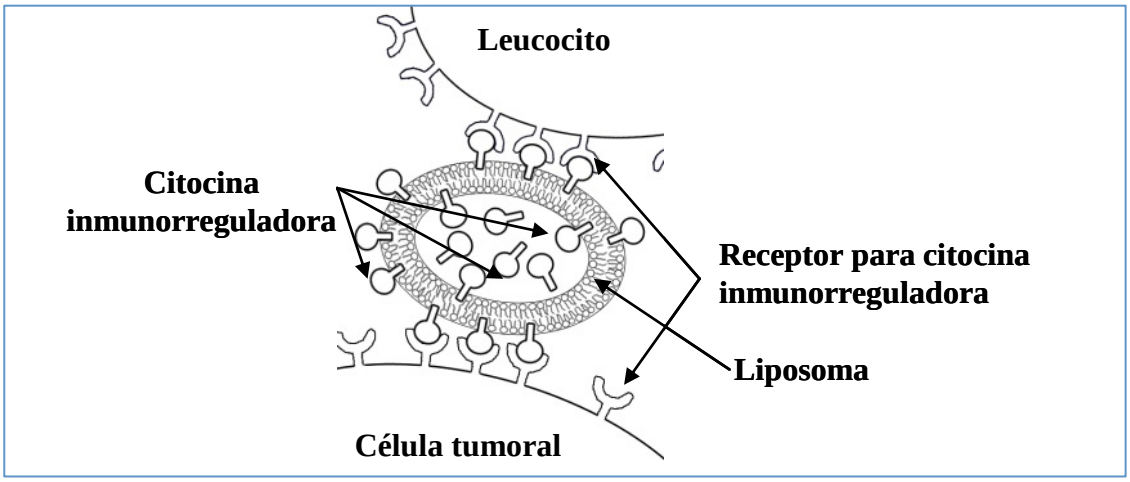


Figura 10.- Representación gráfica del posible puente entre el liposoma, la célula tumoral y una célula del sistema inmune.

Se esperaría que la unión entre las células tumorales y los linfocitos promovida por los liposomas que expresan IL-2 en su superficie externa pueda contribuir a favorecer el reconocimiento de posibles antígenos tumorales y a la activación de células citotóxicas especificas. En este trabajo presentamos evidencias de que los liposomas son capaces de reducir alrededor del 90% el crecimiento tumoral en un modelo de inducción de tumores en ratones.

Además nuestros resultados de estabilidad física y el modelo para la evaluación de la estabilidad biológica nos serán de gran utilidad para la evaluación de la compatibilidad de los liposomas IL-2 con sus posibles vehículos, necesaria como paso previo a las pruebas de fase preclínica en humanos. En este momento, los resultados de estabilidad para preformulación de los liposomas IL-2 nos indican que tenemos dos temperaturas y un pH de máxima estabilidad que son ideales para su formulación en diferentes vehículos farmacéuticos, los cuales serán patentados en breve.

5. AGRADECIMIENTOS

Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, proyectos PAPIIT 220108 y 222108 y por el proyecto ICyT PIUTE 10-100.

6. REFERENCIAS

1. Corona-Ortega, M. T.; *Inducción a la aparición de receptores Fc y a la secreción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales de ratón utilizando liposomas como acarreadores de las citocinas IL-1β e INF;* Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México; México D.F., 2000.

2. Soto-Vázquez, R.; *Análisis epistemiológico de la construcción conceptual a partir del modelo de curvas para un desarrollo biotecnológico*; Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México; México D.F., 2000.
3. Patente presentada: Rangel-Corona, R., et al. Composición de un producto antineoplásico e inmunorregulador y su uso para el tratamiento de cáncer cérvico uterino. Expediente: MX/a/2008/008681.
4. Corona, T.; Rangel, R.; Hernández, M.; Baeza, I.; Ibánez, M.; Weiss, B. Characterization of cationic liposomes having IL-2 expressed on their external surface, and their affinity to cervical cáncer cells expressing the IL-2 receptor. Journal of Drug Targeting*,* **17(7),** 496-501 (2009).
5. Mule, J.; Shu, S.; Rosenberg, S. The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo. Journal of Immunology **135**, 646-652 (1985).
6. Kondapaneni, M.; McGregor, J.; Salvemini, D.; Laubach, V.; Samlowski, W. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is not required for IL-2-induced hypotension and vascular leak syndrome in mice. Journal of Immunotherapy **31***,* 325-333 (2008).
7. Bao, A.; Phillips, W.; Goins, B.; Zheng, X.; Sabour, S.; Natarajan, M. F.; Woolley, F.; Zavaleta, C.; Otto, R. Potential use of drug carried-liposomes for cancer therapy via direct intratumoral injection. International Journal of Pharmacy **316**, 162-169 (2006).
8. Kepczyński, M.; Nawalany, K.; Kumorek, M.; Kobierska, A.; Jachimska, B.; Nowakowska, M. Which physical and structural factors of liposome carriers control their drug-loading efficiency?. Chemical Physical Lipids **155***,* 7-15 (2008).
9. Pellequer, Y.; Ollivon, M.; Barratt, G. Formulation of liposomes associated with recombinant interleukin-2: effect on interleukin-2 activity. Biomedicine & Pharmacotherapy **58**, 162–167 (2004).
10. Fahr, A.; Van Hoogevest, P.; May, S.; Bergstrand, N.; Leigh, M. Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: Consequences for drug delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences **26**, 251–265 (2005).
11. Konigsberg, P.; Godtel, R.; Kissel, T.; Richer, L. The development of IL-2 conjugated liposomes for therapeutic purposes. Biochemical and Biophysics Acta **1370**, 243-251 (1998).
12. Bien, E.; Balcerska, A. Serum soluble interleukin 2 receptor alpha in human cancer of adults and children: a review. Biomarkers **13**, 1-26 (2008).
13. Rangel-Corona, R.; Rodríguez-Cruz, L.; Flores-Flores, G.; Gómez-Ruiz, C.; Soto-Cruz, I.; Mendoza-Rincon, J.F.; Weiss-Steider, B. Differential expression of the two components of the Interleukin-2 receptor in cervical cancer cells. Monduzzie Editors **3***,* 1239-1243 (1998).
14. Rangel-Corona, R.; Corona-Ortega, T.; del Río-Ortiz, I.; Nieves-Ramírez, M.; Morán-Bañuelos, H.; González-Tenorio, O.; Cáceres-Cortés, J.; Weiss-Steider, B. Cationic liposomes bearing IL-2 on their external surface induced mice leukocytes to kill human cervical cancer cells in vitro, and significantly reduced tumor burden in immunodepressed mice. Journal of Drug Targeting **19(2),** 79–85 (2011).
15. Ibáñez, M.; Gariglio, P.; Chávez, P.; Santiago, R.; Wong, C.; Baeza, I. Spermidine-condensed DNA and cone-shaped lipids improve delivery and expression of exogenous DNA transfer by liposomes. Biochemical Cellular Biology **74**, 633-643 (1996).
16. Acosta Gutiérrez, J.; Juárez López, R.; Velasco Lomas, I.; Gil Alegre, M. E.; Rangel-Corona, R.; Weiss-Steider, B.; Soto Vázquez, R.; Corona Ortega, T. Estudios de estabilidad farmacéutica de un sistema constituido por un producto antineoplásico e inmunoregulador para el tratamiento del cáncer cérvico uterino. Revista Portuguesa de Farmácia, P-B 21 (2011).
17. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Q1B. Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products ICH harmonised tripartite guideline. 1996
18. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Q1A(R2) Stability testing of new drug substances and products. 2003.