



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



“Desarrollo de una formulación inhalable del sistema Ad5- NPv30-3 como potencial estrategia génica para el tratamiento de cáncer pulmonar”

TESIS:

Que para obtener el grado de Maestro en Farmacia

PRESENTA EL:

L.F. Antonio Jesús Galindo González

Codirectores de tesis:

Dra. Angélica Meneses Acosta

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Año

Cuernavaca Morelos, noviembre 2022.

JURADO



FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Morelos a 8 de septiembre de 2022
Folio: FF/M/SI/ CIP /MF/102/2022

L. F. ANTONIO JESÉ GALINDO GONZÁLEZ
ALUMNO DE MAESTRÍA EN FARMACIA

PRESENTE

Por este medio le informo que el Consejo Interno de Posgrado (CIP), en su Sesión Ordinaria del 7 de septiembre de 2022, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora y Jurado para la tesis titulada “**Desarrollo de una formulación inhalable del sistema Ad5-NPv30-3 como potencial estrategia génica para el tratamiento de cáncer pulmonar**”:

Sinodal		Adscripción
Presidente	Dra. Dea Herrera Ruiz	Facultad de Farmacia-UAEM
Secretario	Dr. Julio César Rivera Leyva	Facultad de Farmacia-UAEM
Vocal 1	Dr. Sergio Alberto Bernal Chávez	Universidad de las Américas Puebla
Suplente 1	cDr. Carlos Alberto Tavira Montalván	Facultad de Farmacia-UAEM
Suplente 2	Dra. Angélica Meneses Acosta	Facultad de Farmacia-UAEM

Se le solicita entregar el manuscrito de tesis para revisión a esta comisión y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe del Posgrado en Farmacia

ccp: archivo.
Dra. Dea Herrera Ruiz; Dr. Julio César Rivera Leyva; Dr. Sergio Alberto Bernal Chávez; cDr. Carlos Alberto Tavira Montalván; Dra. Angélica Meneses Acosta

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2° piso.
Tel. (777) 329 7000, Ext. 7986 Jefatura de Posgrado en Farmacia, posgrado_ff@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2022-09-09 12:16:04 | Firmante

dHD0btYXRqRmqUwst3c8Ar638AovdNxHWZjgD3jzPtg6slRWIPNWY3V/CfzAfs4WKaslaYfv9npUW9RcZiIntr0ZavXj3Zy+PM73CHf+QCbuTLccZ1h9K5mwkYVC7M9MZngLnZ5
kuEFIOR+zWY2jzweUACMzhdenn089JAMEqH/nCrrVi8J1CLn8fa+Q3mBodLxO8v9lBoVMWwZmMh+UNT2Wn6K2Fs1FosVV6ZQdkg+HhWa0pbeF2uHaZz7gWJ5PHnY02sGBp8f
2rfe7OT2LoX6gi6LtbGCCCh23RTdbhfR1aFLS7VrD59xzzr6G0y2zTqZS/jnTDksBptgSN8dmBQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



5ylou9YL1

<https://efirma.uaem.mx/noRepudioIqKJZLbPnsQacGiraxSvkXV59VXAuHaa>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

“NO SE PUEDE ENSEÑAR NADA A UN HOMBRE,
SÓLO SE LE PUEDE AYUDAR A DESCUBRIRSE A SÍ
MISMO”

GALILEO GALILEI

Lugar de trabajo y financiamiento

El presente proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio 1 de investigación en Tecnología Farmacéutica y en el laboratorio 7 de Biotecnología Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Se agradece al Proyecto INF-2014-226271 de CONACYT y a los recursos autogenerados por el laboratorio 7 de Biotecnología Farmacéutica, por la infraestructura adquirida para desarrollar la parte biológica de este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres, Tere González y Luciano Galindo, sin ellos este logro no habría sido posible. Siempre han estado en cualquier momento y situación para darme un consejo y sobre todo su apoyo incondicional. Gracias a ellos y a dios por darme la dicha de tenerlos en mi vida.

A mi hermano Sebastián Galindo y mi sobrino Aaron Galindo, ya que son aquellas personas muy especiales para mí, sabiendo que mi hermano siempre ha sabido reconocer mi esfuerzo y que estoy seguro, sabe que puedo llegar mucho mas lejos de donde me encuentro ahora. Saber que mi sobrino cree en mí, que puedo ser un ejemplo a seguir y que siempre podrá contar conmigo, así como yo con él.

A mi abuelita Alejandra González, que doy gracias a dios por cuidármela mucho porque siempre la voy a llevar en mi corazón.

A Fernanda Ahedo, mi mujer, acompañante, amiga y colega. Gracias por estar conmigo en cada momento, motivarme a seguir adelante, creer en mí, concluir una etapa más y sobre todo por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado con la beca 942830.

Al Dr. Sergio Alcalá Alcalá por brindarme su apoyo desde el segundo semestre de la Licenciatura. Gracias por todos los proyectos en los que me dio oportunidad trabajar y seguir creciendo.

A la Dra. Angélica Meneses Acosta por permitirme profundizar en el área de biotecnología farmacéutica y aprender sobre temas de interés.

A la M en F. Lorena Uribe Toledo por el apoyo en la comprensión inicial de este proyecto basado en su tesis de maestría.

Al cDr. Carlos Tavira Montalván por todo el apoyo durante los estudios realizados en el laboratorio 7 de biotecnología en la Facultad de Farmacia.

Al grupo de investigación de la Dra. Angélica Meneses de la Facultad de Farmacia por el apoyo en los seminarios de investigación, experimentos realizados, así como la comprensión de los tópicos tratados.

A mi comité tutorial; el Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales y la Dra. Dea Herrera Ruíz por aceptar formar parte de este, por los consejos, el apoyo y los comentarios enriquecedores de cada evaluación, así como, también fuera de este.

Agradezco a mis padres por todo el apoyo a lo largo de mi vida y siempre estar en los momentos más importantes de mi vida.

Agradezco a todos mis profesores y asesores de la licenciatura en Farmacia, por todos los conocimientos transmitidos, consejos y apoyo a lo largo de mi carrera, así como la motivación para aspirar a ser más grande en el ámbito profesional y humano.

Agradezco a mis compañeros de la licenciatura, Martín Padilla y Leonardo Romo que siempre han sido personas importantes a lo largo de mi vida profesional y personal. Ellos siempre me motivaron a aprender más, ser competente y llegar más lejos.

Agradezco a la vida por la oportunidad de estudiar, crecer y generar conocimientos en un área tan importante.

Finalmente agradezco a quien lee este apartado y más de mi tesis, por permitir a mi esfuerzo, investigación y dedicación incurrir dentro de su información mental.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
NOMENCLATURA.....	8
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUCCIÓN.....	17
2 MARCO TEÓRICO.....	20
2.1 Aspectos generales del cáncer.....	20
2.2 Cáncer pulmonar.....	21
2.3 Estrategias terapéuticas para el tratamiento de cáncer.....	22
2.3.1 Terapia génica, tecnología prometedora.....	25
2.4 Adenovirus como vectores virales.....	28
2.5 Formulaciones en la terapia génica de cáncer pulmonar.....	30
2.6 Vía inhalatoria o pulmonar como ruta de administración.....	34
2.6.1 Deposición pulmonar de partículas.....	37
2.6.2 Formulaciones para la terapia por inhalación.....	40
3 ANTECEDENTES.....	46
Determinación de la LC ₅₀ de Ad5/NPv30-3 en cultivos de A549.....	46
4 JUSTIFICACIÓN.....	48
5 HIPÓTESIS.....	49
6 OBJETIVOS.....	49
6.1 Objetivo general.....	49
6.2 Objetivos específicos.....	49
7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	50
8 MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
8.1 Estudios de preformulación.....	51
8.1.1 Obtención de las preparaciones para la liofilización.....	51
8.1.2 Obtención de polvos liofilizados.....	51
8.2 Caracterización física de los polvos liofilizados.....	53

8.2.1	Apariencia y consistencia.	53
8.2.2	Capacidad para crear mezclas.	53
8.2.3	Rendimiento de liofilización.	54
8.2.4	Tiempo de reconstitución.....	55
8.3	Pruebas de Formulación como polvos secos para inhalación (DPI).	55
8.4	Caracterización de los DPI.....	56
8.4.1	Propiedades reológicas.	56
8.4.2	Aerolización; diámetro de masa media aerodinámica (MMAD).	59
8.5	Carga de partículas adenovirales en la formulación óptima.	61
8.6	Evaluación de la eficacia <i>in vitro</i> de los polvos liofilizados cargados con el sistema Ad5-NPV-30.	62
8.6.1	Título viral.....	62
8.6.2	Ensayo de infectividad.....	64
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
9.1	Preformulación parte I.- Obtención de las formulaciones para la liofilización.	66
9.2	Preformulación parte II.- Desarrollo y caracterización de las formulaciones de crioprotectores.	67
9.2.1	Apariencia y consistencia.	69
9.2.2	Capacidad para crear mezclas.	70
9.2.3	Rendimiento del proceso de liofilización.	71
9.2.4	Tiempo de reconstitución.....	73
9.3	Estudios de Formulación.....	75
9.3.1	Obtención de los DPIs.	75
9.4	Caracterización de los DPIs.....	76
9.4.1	Propiedades reológicas	76
9.4.2	Aerolización y diámetro de masa media aerodinámica.	78
9.5	Carga del sistema Ad5-NPV-30 en los polvos liofilizados.....	80
9.6	Evaluación de la eficacia <i>in vitro</i>	81
9.6.1	Título viral.....	81
9.6.2	Ensayo de infectividad (eficacia <i>in vitro</i>).	83
10	CONCLUSIONES	86
10.1	Conclusiones particulares	87

11	PERSPECTIVAS	88
12	REFERENCIAS	89
13	ANEXOS	98
13.1	Ensayo de viabilidad celular	98
13.2	Constancias de participación	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático que ilustra los diferentes tipos de cáncer pulmonar.....	22
Figura 2. Enfermedades blanco en terapia génica.	26
Figura 3. Vectores más utilizados en los ensayos clínicos de terapia génica.	28
Figura 4. Estructura del adenovirus y su organización genómica.	29
Figura 5. Anatomía del sistema respiratorio.	35
Figura 6. Administración pulmonar de agentes terapéuticos de edición del genoma mediada por vectores virales o no virales.	37
Figura 7. Tipos de deposición de partículas	40
Figura 8. Porcentaje de viabilidad de las células A549: con azul de tripano en cultivos sin infectar.....	47
Figura 9. Formulaciones sometidas a proceso de liofilización.	53
Figura 10. Determinación de la densidad aparente y compactada de las formulaciones óptimas.	57
Figura 11. Evaluación del ángulo de reposo de las formulaciones óptimas.	58
Figura 12. Impactador de cascada de Andersen	60
Figura 14. Ensayo de título viral por el método End Point Dilution.....	63
Figura 13. Vial de la formulación liofilizada con Ad/NPv30-3.....	63
Figura 16. Formulaciones en 10 mL (F1-F6) obtenidas posterior al proceso de liofilización.	68
Figura 15. Formulaciones en 500 μ L (F1-F6) obtenidas posterior al proceso de liofilización.	68
Figura 18. Proceso de reconstitución de la formulación 5.	74
Figura 17. Proceso de reconstitución de la formulación 3.	74
Figura 19. Polvo liofilizado optimizado de la formulación 3.....	75
Figura 20. Polvo liofilizado optimizado de la formulación 5.....	75
Figura 21. Prueba de esterilidad de L3 y L5 en caldo nutritivo.	80
Figura 22. Prueba de esterilidad de L3 y L5+ Ad5/NPv30-3 en caldo nutritivo. ...	80
Figura 23. Título viral promedio de la suspensión stock sin liofilizar, F3/ Ad5/NPv30-3. y F5/ Ad5/NPv30-3 liofilizadas.....	82
Figura 24. Células A549 transducidas con 100 μ l de las formulaciones F3 y F5 a las 96 h por triplicado teñidas con cristal violeta vistas a un objetivo 10x.	84
Figura 25. Células A549 infectadas con Ad5-NPv30-3- MOI 30 a las 72h teñidas con cristal violeta vistas en un objetivo 10x.....	85

Figura 26. Cultivo A549 transducido con Ad5-Npv30-3- MOI 30 y con F3 y F5. ... 86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Terapéutica actual contra el cáncer de pulmón, su mecanismo de acción y efectos secundarios comunes	23
Tabla 2. Tipos de vectores viales más utilizados en terapia génica.	27
Tabla 3. Lista de excipientes utilizados en formulaciones adenovirales.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4. Distribución y deposición de partículas en el sistema respiratorio basado en el tamaño de partícula MMAD	39
Tabla 5. Lista de lactosas grado inhalación disponible comercialmente	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 6. Determinación LC50 con el método estadístico Probit	47
Tabla 7. Cantidades a adicionar de excipientes en formulaciones con un volumen de 10 mL.	52
Tabla 8. Cantidades a adicionar de soluciones de excipientes en formulaciones con un volumen de 500 μ L.	52
Tabla 9. Desarrollo de las mezclas con respecto a las proporciones de lactosa-liofilizado de las formulaciones óptimas (F3 y F5).	56
Tabla 10. Formulaciones propuestas de crioprotectores para Ad5/NPv30-3, enumeradas de F1-F6.	67
Tabla 11. Evaluación de apariencia y consistencia de las preparaciones liofilizadas; a: con glicerol al 5%, b: sin glicerol.	69
Tabla 12. Capacidad de las preparaciones liofilizadas para crear mezclas con polvos farmacéuticos	71
Tabla 13. Cálculo de los porcentajes de rendimiento para las formulaciones recuperadas (F2, F3 y F5).	72
Tabla 14. Tiempo de reconstitución de las formulaciones obtenidas en estado sólido.	73
Tabla 15. Determinación de la reología de las mezclas en proporción 1:1 (lactosa: liofilizado).	76
Tabla 16. Determinación de la reología de las mezclas en proporción 2:1 (lactosa: liofilizado).	77
Tabla 17. Determinación de la reología de las mezclas en proporción 1:2 (lactosa: liofilización.	77
Tabla 18. Diámetro de masa media aerodinámico (MMAD) para los DPIs 3 y 5 con Lactohale® 201 (LH201).	79

Tabla 19. Evaluación de los títulos virales promedio del stock Ad5/NPv30-3, DPI3 y DPI5 en cultivo celular HEK 293 ± desviación estándar. 82

Tabla 20. Porcentaje de viabilidad de cultivos celulares transducidos con DPI3 y DPI5 + controles positivos y negativos..... 84

Tabla 21. Porcentaje de viabilidad de cultivos celulares transducidos con DPI 3 y DPI 5 + control positivo y negativo por MTS a 3 concentraciones 98

NOMENCLATURA

AAV	Virus Adenoasociado
A549	Células humanas de epitelio alveolar basal
Ad2	Adenovirus tipo 2
Ad5	Adenovirus tipo 5
Ad5/WT	Adenovirus tipo 5 silvestre
ADC	Adenocarcinoma
Ad5/NPv30-3	Vector adenoviral que expresa la proteína Nodulina 30-3
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALK	Gen del receptor de la tirosina quinasa
ANOVA	Análisis de varianza
CAR	Receptor Adenoviral Coxsackie
CDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPI	Dry Powder Inhaler, por sus siglas en inglés Inhalador de polvo seco
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
EST	Marcador de secuencia expresada
F3	Formulación 3
F5	Formulación 5
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (Food and Drug administration, por sus siglas en inglés)
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
HCl	Ácido clorhídrico
HEK 293	Células de riñón de un embrión de humano (Human Embryonic Kidney cell 293, por sus siglas en inglés).
IBT-UNAM	Instituto de Biotecnología, UNAM
IC	Índice de Carr

IH	Índice de Hausner
INCan	Instituto Nacional del Cancer
LC ₅₀	Concentración letal media
LCC	Carcinoma de células grandes
mAbs monoclonales	Monoclonal antibodies, por sus siglas en inglés Anticuerpos monoclonales
MCF-7	Células de Cáncer de mama
MCP	Muerte celular programada
MDI	Inhalador de dosis medida
MOI	Multiplicidad de infección
NSCLC	Non-small cells lung cancer, por sus siglas en inglés Cáncer de pulmón de células no pequeñas
NPv30	Proteína Nodulina 30
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCD	Muerte celular programada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Muerte programada 1
PD-L1	Ligando de muerte programada 1
Pfu	Unidades formadoras de placa
Pfu/mL	Unidades formadoras de placa por mililitro
PSD	Distribución del tamaño de partícula
RNAi	Ácido Ribonucleico Interferente
RTK	Receptor tirosina quinasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SCC	Carcinoma de células escamosas
SCLS	Small cells lung cancer, por sus siglas en inglés cáncer pulmonar de células pequeñas
TCID ₅₀	Dosis infecciosa 50
TG	Terapia génica

UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WT	Adenovirus silvestre tipo 5

RESUMEN

El cáncer pulmonar es una de las enfermedades más comunes en todo el mundo y la principal causa de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo, con un estimado de 2 millones de casos nuevos y 1,76 millones de muertes por año. Siendo que cerca de la mitad de casos son de próstata, seno y pulmón. Los tratamientos actuales para éste incluyen quimioterapias que son aplicadas por rutas invasivas como la intravenosa, aplicando altas y frecuentes dosis que producen efectos sistémicos que no han hecho eficiente el tratamiento, por lo que una ruta más directa sería ideal para colocar el fármaco en el sitio donde debe ejercer su acción; en este sentido la vía inhalatoria o pulmonar sería más adecuada, debido a su fácil acceso, seguridad y la capacidad de dirigir la administración hacia a una acción local.

Además, debido al difícil acceso al tejido y a los medicamentos poco beneficiosos no se ha logrado desarrollar un tratamiento dirigido con alta eficiencia terapéutica y reducidos efectos no deseados, por lo que es necesario continuar con el desarrollo y búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento. Así, la terapia génica es una de las estrategias novedosas utilizadas para causar un efecto de muerte celular programada haciendo uso de vectores virales que transfieran genes terapéuticos hacia el interior de la célula cancerosa. Estudios previos en el grupo de investigación evidenciaron que la proteína Nodulina 30-3 (NPv30-3) en un sistema vector adenoviral no replicativo induce muerte celular programada (MCP) *in vitro* en cultivos de células animales, poniéndola en contexto como potencial biofármaco para terapia génica de cáncer pulmonar.

Por ello, el objetivo de este trabajo es establecer una formulación inhalable mejorada para el vector adenoviral Ad5/Npv30-3 y evaluar su eficacia en cultivos *in vitro* de células A549. Para su desarrollo, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre el uso de excipientes para formular productos para terapia génica y sistemas para inhalación como polvos secos, capaces de acarrear vectores virales. Se diseñaron y desarrollaron 6 formulaciones (F1 a F6) con el uso de albúmina, sacarosa, PEG 300, trehalosa, manitol, isoleucina y dextrosa. Dichas formulaciones se liofilizaron y caracterizaron en sus propiedades tecnológicas como

aparición, tiempos de reconstitución, porcentaje de rendimiento y capacidad para crear mezclas con la finalidad de determinar la formulación con las mejores propiedades. Una vez establecidas las posibles formulaciones, estas se escalaron a un volumen mayor para desarrollar las pruebas de formulación conteniendo el Ad5/NPv30-3. Para la etapa I de formulación se liofilizaron las formulaciones F3 y F5, las cuales se mezclaron con diversas lactosas para inhalación para determinar las propiedades de aerolización y reológicas adecuadas para la vía pulmonar. Una vez desarrolladas y bien caracterizadas, los polvos secos seleccionados se cargaron con el sistema Ad5/NPv30-3 para lograr determinar la eficacia de las formulaciones en cuanto a mantener a la partícula viral estable durante el proceso y así poder evaluar el título viral y la infectividad *in vitro* en un modelo de cáncer pulmonar A549.

De las 6 formulaciones propuestas solo 3 lograron el estado sólido posterior a la liofilización, con aparición como polvo seco homogéneo y con buen comportamiento de flujo, (F2, F3 y F5 sin glicerol) y con una alta capacidad para crear mezclas con otros polvos. Solo F3 y F5 presentaron buen porcentaje de rendimiento (del 85.5 y 90.9 % respectivamente), con tiempos de reconstitución <10 segundos. Estas formulaciones ya liofilizadas (L3 y L5) y formuladas con la lactosa LH201 (Lactohale ®), a proporción 1:2 (polvos secos DPI3 y DPI5) mostraron un comportamiento reológico muy similar con excelentes propiedades de flujo en las 3 proporciones de mezclas utilizadas, con densidades <5 g/mL que son ideales para un polvo para inhalación. Posteriormente se desarrolló la prueba de aerolización y diámetro de masa aerodinámica (MMAD) encontrando un promedio de $1.05 \pm 0.09 \mu\text{m}$ a la proporción 1:2 con LH 201, por lo que ambas formulaciones, se utilizaron para continuar con el estudio de carga del sistema Ad5/NPv30-3 y la evaluación de eficacia, donde se encontraron valores de título para DPI3 Y DPI5 de $1.26 \times 10^5 \pm 1.69 \times 10^4$ y $5.72 \times 10^5 \pm 1.67 \times 10^5$, respectivamente. Los ensayos de infectividad *in vitro* en A549 confirmaron la presencia de la proteína NPv30-3, la cual debido a su expresión genera una reducción de la viabilidad celular en este modelo de cáncer pulmonar, con valores porcentuales de viabilidad celular del 68 ± 3.1 y 73 ± 2.5 %

para DPI 3 y DPI5, respectivamente, en comparación con el control del sistema Ad5/NPv30-3 sobre el mismo cultivo sin formular con un 62% de viabilidad.

Así, se concluye que fue posible formular en estado sólido al sistema Ad5/NPv30-3, el cual presentó propiedades tecnológicas adecuadas para la administración pulmonar, con la transducción efectiva del transgene ya que fue capaz de inducir muerte celular en las células A549, el cual se usó como modelo de cáncer pulmonar *in vitro*, por lo que la estrategia de formulación aquí presentada en polvos secos para inhalación para un potencial producto de terapia génica puede ser utilizada como una alternativa terapéutica para atender el problema de salud en cuestión.

ABSTRACT

Lung cancer is one of the most frequently diagnosed cancers and the leading cause of cancer-related deaths worldwide with an estimated 2 million new cases and 1.76 million deaths per year. Being that about half of cases are prostate, breast and lung. Current treatments for this include chemotherapies that are applied by invasive routes such as intravenous, applying high and frequent doses that produce systemic effects that have not made the treatment efficient, so a more direct way would be ideal to place the drug on the site where it must exercise its action; In this sense, the inhalation or pulmonary route would be more appropriate, due to its easy access, safety and the ability to direct the administration towards a local action.

In addition, due to the difficult access to the tissue and to the less beneficial drugs, it has not been possible to develop a targeted treatment with high therapeutic efficiency and reduced side effects, so it is necessary to continue with the development and search for new treatment alternatives. Thus, gene therapy is one of the novel strategies used to cause an effect of programmed cell death by making use of viral vectors that transfer therapeutic genes into the interior of the cancer cell. Previous studies in the research group showed that the Nodulin 30-3 protein (NPv30-3) in a non-replicative adenoviral vector system induces programmed cell death (PCM) in vitro in animal cell cultures, putting it in context as a potential biopharmaceutical for therapy lung cancer gene. Therefore, the objective of this work is to establish an improved inhalable formulation for the Ad5/Npv30-3 adenoviral vector and to evaluate its efficacy on in vitro cultures of A549 cells. For its development, an exhaustive bibliographic search was carried out on the use of excipients to formulate products for gene therapy and systems for inhalation as dry powders, capable of carrying viral vectors. Six formulations (F1 to F6) were designed and developed with the use of albumin, sucrose, PEG 300, trehalose, mannitol, isoleucine and dextrose. These formulations were lyophilized and characterized in their technological properties such as appearance, reconstitution times, yield percentage and ability to create mixtures in order to determine the formulation with the best properties. Once the possible formulations were established, they were

scaled to a larger volume to develop the formulation tests containing Ad5/NPv30 3. For stage I, formulations F3 and F5 were lyophilized and mixed with various lactoses for inhalation to determine the appropriate aerolization and rheological properties for the pulmonary route. Once developed and well characterized, the selected dry powders were loaded with the Ad5/NPv30-3 system to determine the effectiveness of the formulations in terms of keeping the viral particle stable during the process and thus be able to evaluate the viral titer and the in vitro infectivity in an A549 lung cancer model. Of the 6 formulations proposed, only 3 achieved the solid state after lyophilization, with the appearance of a homogeneous dry powder and with good flow behavior (F2, F3 and F5 without glycerol) and with a high capacity to create mixtures with other powders. Only F3 and F5 presented a good yield percentage (85.5 and 90.9%, respectively), with reconstitution times <10 seconds. These already lyophilized formulations (L3 and L5) and formulated with lactose LH201 (Lactohale ®), at a 1:2 ratio (DPI3 and DPI5 dry powders) showed a very similar rheological behavior with excellent flow properties in the 3 mixture proportions used with densities <5 g/mL which are ideal for an inhalation powder. Subsequently, the aerolization and aerodynamic mass diameter (MMAD) test was developed, finding an average of $1.05 \pm 0.09 \mu\text{m}$ at a 1:2 ratio with LH 201, so both formulations were used to continue with the system load study Ad5/NPv30-3 and efficacy evaluation, where titer values for DPI3 and DPI5 of $1.26 \times 10^5 \pm 1.69 \times 10^4$ and $5.72 \times 10^5 \pm 1.67 \times 10^5$, respectively, were found. In vitro infectivity assays in A549 confirmed the presence of the NPv30-3 protein, which, due to its expression, generates a reduction in cell viability in this model of lung cancer, with cell viability percentage values of 68 ± 3.1 and $73 \pm 2.5\%$ for DPI 3 and DPI5, respectively, compared to the Ad5/NPv30-3 system control on the same unformulated culture with 62% viability.

Thus, it is concluded that it was possible to formulate the Ad5/NPv30-3 system in a solid state, which presented adequate technological properties for pulmonary administration, with effective transgene transduction since it was capable of inducing cell death in A549 cells, the which was used as an in vitro lung cancer model, so the formulation strategy presented here in dry powders for inhalation for a potential gene

therapy product can be used as a therapeutic alternative to address the health problem in question.

1 INTRODUCCIÓN

El cáncer pulmonar es una de las enfermedades que ocupan los primeros lugares a nivel mundial, con una incidencia anual de alrededor de 1.8 millones de muertes por esta causa (Lancet, 2021). En México se han registrado más de 7 mil 811 casos nuevos y 6 mil 733 muertes por cáncer de pulmón según estadísticas del 2020 (INCan, 2020). Se ha destacado la importancia de que los tratamientos actuales son poco eficientes y los existentes presentan efectos adversos severos que afectan significativamente a los pacientes, debido a su falta de especificidad. Es por ello por lo que se ha hecho hincapié en generar nuevos tratamientos que de primera instancia presenten efectividad y seguridad para el paciente y que además se tenga la posibilidad del uso de las distintas vías de administración con la finalidad de reducir los efectos adversos generados, hacer una terapia más dirigida y a su vez mejorar las propiedades de los ingredientes farmacéuticos activos disponibles.

Entre los tratamientos actuales para el cáncer pulmonar se tienen la cirugía, radioterapia y quimioterapia, donde en algunos casos se usan terapias combinadas. Dentro de la quimioterapia, se emplean medicamentos administrados por vía oral o intravenosa, los llamados antineoplásicos, que son moléculas pequeñas que impiden el desarrollo, crecimiento, o proliferación de células tumorales malignas que presentan tasas de reproducción elevadas tal y como lo hacen las células de la piel, uñas, cabello y células sanguíneas, por lo que se generan daños severos a nivel sistémico.

Además del uso de moléculas pequeñas para el tratamiento de cáncer pulmonar, en los últimos años se han desarrollado investigaciones sobre el uso de moléculas grandes en la terapia como proteínas donde destacan algunas hormonas, interferones, citoquinas y anticuerpos monoclonales, así como ácidos nucleicos en los que destacan los oligonucleótidos antisentido (ASOs), aptámeros de ADN, distintos tipos de ARN y la terapia génica. Esta última se basa en reemplazar genes con funciones anormales o ausentes por una variante del gen que funciona correctamente. El gen que se desea introducir es transportado por vectores de tipo no viral o viral.

Los avances en la terapia génica contra cáncer se han desarrollado y concretado desde hace poco más de 30 años con el uso de vectores virales, principalmente adenovirus del tipo 2 y tipo 5, de la familia *Adenoviridae*, siendo estos los tipos mayormente caracterizados, y una manera de introducir genoma exógeno de una forma natural hacia el núcleo de una diana. A partir de la primera patente de terapia génica (Gendicine®) contra cáncer de cabeza y cuello, aprobado en 2003 y de donde surgieron diversas patentes posteriormente, se posicionó a la terapia génica como una alternativa prometedora en la terapia de diversas enfermedades.

La vía de administración, en respuesta al tratamiento con adenovirus recombinante, juega un papel muy importante. Según ensayos clínicos, durante una inyección intratumoral se induce una mayor inmunidad antitumoral y a su vez se genera una menor toxicidad comparada con una administración intravenosa utilizando adenovirus en ambos casos. Por lo que, a pesar de los grandes resultados en la eficacia y seguridad, dicha alternativa al momento de ser administrada tiende a ser un tanto invasiva en la administración *in situ*.

Es por lo que la tecnología farmacéutica se ha enfocado en el desarrollo de nuevas formulaciones, que para el caso de partículas virales se mezclen con excipientes adecuados que protejan y estabilicen al propio activo, incluso con la finalidad de ser administradas por vías alternas a las ya existentes, aquellas que estén destinadas a generar un efecto local. Una de ellas, es la vía inhalatoria dado el estudio a lo largo de los años del propio sistema respiratorio como una vía de administración para generar efectos sistémicos o locales dada su estructura anatómica y fisiológica. Es por ello que nace la importancia de utilizarla como una vía de administración para la terapia génica gracias a sus propiedades.

Dentro del mismo ámbito farmacéutico, el uso de las tecnologías existentes para la administración de biológicos se basa en desarrollar formulaciones, que, con la ayuda de excipientes aprobados para la vía en cuestión, otorguen seguridad y eficacia y que a su vez se puedan caracterizar ampliamente. Ha sido materia de estudio tanto en modificar la forma farmacéutica, que para la terapia génica se basan en sistemas inyectables en el estado líquido o en suspensión, así como modificar la formulación, para llegar, ya sea a un estado líquido estable o sólido, sin

perder las propiedades del vector viral recombinante con potenciales y prometedores resultados.

Es por lo anterior que en el presente proyecto se desarrollaron y caracterizaron formulaciones en estado sólido, para producir un polvo seco para inhalación de una partícula viral en suspensión denominada como Ad5/NPv30-3, la cual es un vector adenoviral recombinante con el transgén para producir la proteína NPv30-3 que se ha estudiado y genera muerte celular programada en modelos *in vitro* en células A549, e incluso modelos *in vivo* de cáncer. Se obtuvieron dos formulaciones mejoradas en el estado sólido del sistema Ad5-NPv30-3 con propiedades tecnológicas adecuadas para ser administradas por la vía pulmonar, las cuales mantienen su eficacia, de acuerdo con los ensayos *in vitro* en cultivo de células animales realizados.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Aspectos generales del cáncer.

Se denomina cáncer al conjunto de enfermedades relacionadas en las que se observa un proceso descontrolado en la división de las células del cuerpo. En cualquier tipo de cáncer, algunas de las células del cuerpo se dividen sin detenerse y comienzan a diseminarse a los tejidos periféricos, proceso conocido como metástasis (INCan, 2020).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que el cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo, debido a que en 2018 se atribuyeron a dicha enfermedad 9.6 millones de defunciones, determinando que los 5 tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son el pulmonar con 1,76 millones de defunciones, colorrectal con 862 mil, gástrico con 783 mil, hepático con 782 mil, y mamario con 627 mil (INCan, 2020).

Además, datos recientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) indican que el cáncer de pulmón en México ocupa el séptimo lugar en frecuencia, considerándose el tumor más letal, ya que cerca de 8 mil mexicanos fallecen al año a causa de esta neoplasia. Se ha destacado que la problemática ha mostrado una tendencia relacionada al diagnóstico tardío y a la deficiencia de tratamientos innovadores y/o abandono al apego terapéutico debido a las reacciones adversas de los tratamientos ya existentes (Secretaría de Salud, 2018).

El crecimiento y división celular es un proceso normal que realizan las células para formar nuevas a medida que el cuerpo las necesita. Células nuevas remplazan a aquellas que envejecen o se dañan, mediante procesos de muerte celular programada (Guerin, D.J., et al, 2021; Tang, D., et al, 2019; Noguchi M et al 1995). En el cáncer, este proceso ordenado se ve descontrolado. Donde las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, formando células nuevas cuando no se necesitan. De tal forma que dichas células pueden dividirse sin interrupción formando masas llamados tumores.

Las células cancerosas se diferencian de las células normales ya que son menos especializadas y no maduran como las normales, lo que permite su continua división

y crecimiento sin control, volviéndose invasivas, además de que estas células evaden aquellas señales para que dejen de dividirse o que entren a procesos de muerte celular programada o apoptosis, el cual consiste en deshacerse de células no necesarias o incluso inducir a que las células normales formen vasos sanguíneos para suministrar oxígeno y nutrientes para el crecimiento de los tumores. Las células cancerosas, con frecuencia, son también capaces de evadir el sistema inmunitario, una red de órganos, tejidos y células especializadas que protege al cuerpo contra infecciones y otras enfermedades (Matthews, H.K., et al, 2022; Moulton JE 1998). Aunque ordinariamente el sistema inmunitario elimina del cuerpo las células dañadas o anormales, algunas células cancerosas son capaces de "escondarse" de este (Ok *et al.*, 2017).

2.2 Cáncer pulmonar.

El cáncer pulmonar es el cáncer más común y la causa principal de muerte a nivel mundial y no distingue género. Según estadísticas en el 2019 este tipo de cáncer ocupa un 11.6% de todos los tipos existentes, con una tasa de mortalidad del 18.4% (Wong M.C.S et al 2017).

Se le denomina al cáncer de pulmón como una enfermedad heterogénea que emana cuando ocurren alteraciones genéticas y epigenéticas en el epitelio pulmonar (Amarararthna *et al.*, 2019).

Uno de los principales factores asociados al desarrollo de tumores pulmonares es la exposición frecuente al humo del tabaco. Sin embargo, se han estimado otros factores asociados que causan entre un 10 y 25% a personas no fumadoras como la exposición a carcinógenos exógenos, como productos del diésel, radón, humos domésticos y algunos tipos de radiación (Couraud S et al 2012; Kenfield SA et al 2008). El cáncer pulmonar se puede clasificar según las características clínicas y terapéuticas como: cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, según sus siglas en inglés) también llamado cáncer no microcítico y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, según sus siglas en inglés), conocido como cáncer microcítico (Smolle, E., et al 2019; Zappa, C., & Mousa, S.A. 2016; Mulshine JL et

al 1993). El primero se divide en carcinoma de células escamosas (SCC), adenocarcinoma (ADC) y carcinoma de células grandes (LCC), según sus siglas en inglés (Petersen, I 2011; Brambilla, E et al 2004).

El cáncer de pulmón microcítico generalmente se encuentra en el bronquio principal, mientras que el SCC se inicia en los bronquios segmentarios del tallo principal. Aquéllos que emergen en los tejidos pulmonares periféricos son el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes como se muestra en la **Figura 1** (Wong M.C.S et al 2017; Curran, WJ 2001)

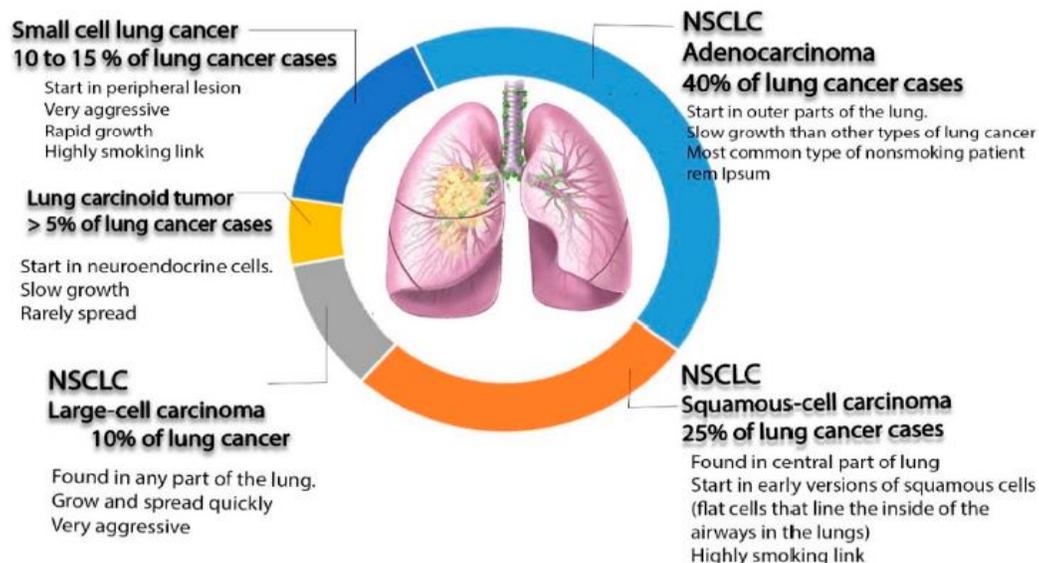


Figura 1. Diagrama esquemático que ilustra los diferentes tipos de cáncer pulmonar (cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP), cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP) y tumores cancerígenos pulmonares, así como el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Modificado de Essa, ML et al 2020).

2.3 Estrategias terapéuticas para el tratamiento de cáncer.

De forma general, los tratamientos actuales para los diferentes tipos de cáncer se basan en función del estado general de salud del paciente, la etapa y las preferencias de éste. La cirugía y la radioterapia forman parte de aquellos

tratamientos utilizados cuando el cáncer se localiza en un área o región específica, donde es común observar ambas terapias en conjunto (Sun, H.R., et al 2019).

La quimioterapia es definida como el uso de medicamentos para tratar el cáncer, usualmente para aquellos que se han esparcido a otras partes del cuerpo (Sun, H.R., et al 2019; Tamura 2001).

La acción de la radioterapia y muchos agentes quimioterapéuticos se basan en el daño al ADN, basado principalmente en la acción inhibitoria de procesos celulares, tales como la transcripción y replicación (Hosoya y Miyagawa, 2014).

Desafortunadamente, las terapias existentes hasta este momento presentan efectos secundarios graves, ya que no solo dañan a las células cancerígenas sino a las células normales y a aquéllas que presentan alto y continuo crecimiento tales como las células hematopoyéticas, folículos pilosos, células del tracto digestivo y boca. En particular algunos de estos tratamientos que se encuentran disponibles para tratar el cáncer pulmonar están enlistados en la **Tabla 1** (Lad, T et al 1994; American Cancer Society, 2013; Amararathna *et al.*, 2019)

Tabla 1. Terapéutica actual contra el cáncer de pulmón, su mecanismo de acción y efectos secundarios comunes (Amararathna *et al.*, 2019).

Fármaco	Aprobación por la FDA	Mecanismo de acción en cáncer pulmonar	Efectos secundarios
Cisplatino	1978	<ul style="list-style-type: none"> • Inducción del estrés oxidativo • Formación de aductos de ADN • Inducción por apoptosis 	Nefrotoxicidad Ototoxicidad Neurotoxicidad
Carboplatino	1989	<ul style="list-style-type: none"> • Formación de entrecruces de ADN entre hileras e intracapas • Inhibición de la síntesis de DNA 	Anemia Neutropenia Trombocitopenia
Crizotinib	2011	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de ALK, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos • Inhibición de ROS 1 • Supresión del crecimiento 	Neumonitis Bradicardia Trastornos de la visión

		<ul style="list-style-type: none"> • Inducción por apoptosis 	
Atezolizumab	2016	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la interacción entre PD-L1 y el receptor PD-1 • Inducción de la actividad antitumoral de células T 	Fatiga Diarrea Nausea
Bevacizumab	2006	<ul style="list-style-type: none"> • Fusión con VEGF • Inhibición de la actividad de VEGF • Prevención de la proliferación de células endoteliales • Supresión de angiogenesis 	Hipertensión Complicaciones en la cicatrización de la herida
Ceritinib	2006	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la autofosforilación de ALK, receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina y ROS 1 	Dolor abdominal Diarrea Hiperglicemia
Paclitaxel	2012	<ul style="list-style-type: none"> • Fusión con β-tubulina • Estabilización de microtúbulos • Inhibición del ciclo celular y la fase mitótica. 	Neutropenia Nausea y vomito Artralgia
Metotrexato	2014	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la síntesis de nucleótidos de purina • Supresión de la síntesis de ADN • Inhibición de la proliferación de células 	Hepatotoxicidad Osteonecrosis Necrosis de tejidos blandos

ALK, Receptor tirosina quinasa del linfoma anaplásico; PD-L1, ligando de muerte programada 1; PD-1, muerte programada 1; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular; ROS1, un gen que codifica el receptor tirosina quinasa (RTK) de la familia de receptores de insulina.

Es por ello que se han desarrollado nuevas terapias. Tal es el caso de la inmunoterapia, que ha propuesto el uso de citocinas tales como: interleucinas, interferones, factores estimulantes de colonias, y anticuerpos monoclonales (mAbs, *Monoclonal Antibodies*), siendo estos una versión artificial de una proteína específica del sistema inmune, que ataca el factor de crecimiento del endotelio

vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*, proteína encargada de formar nuevos vasos sanguíneos). Cabe mencionar que en algún momento dichos tratamientos dejan de funcionar debido a que las células del cáncer generan mutaciones en diversos genes, por ello existen medicamentos destinados a las diversas mutaciones que se han encontrado como en el gen EGFR, T790M, ALK, entre otros (American Cancer Society, 2018).

Dentro de la quimioterapia actual de esta enfermedad, las formas farmacéuticas disponibles son por vía oral (como tabletas y cápsulas) y principalmente para la administración intravenosa (soluciones o suspensiones inyectables), las cuales no han sido del todo eficientes para disponer el fármaco o activo en cantidad suficiente en las células tumorales y comúnmente su aplicación está asociada a diversos efectos no deseados, relacionados con la dosis y la acción sistémica (Amjad, M.T., et al 2022)

2.3.1 Terapia génica, tecnología prometedora.

La terapia génica (TG) se basa en la inserción de material genético hacia una célula blanco, modificando la expresión de genes o llevando a cabo la corrección de genes mutados que producen proteínas defectuosas y que en consecuencia causan el desarrollo de ciertas enfermedades (Katz, MG et al 2019).

Ensayos clínicos reportados se han llevado a cabo desde hace más de 30 años con resultados prometedores, pero algunas complicaciones han surgido como efectos no deseados, por lo que hasta la fecha se continúa investigando nuevos y novedosos sistemas que mejoren dichas propiedades. Hasta el 2019 la terapia génica había mostrado una gran dirección en el tratamiento del cáncer con un 66.8 %, como se muestra en la **Figura 2** (Journal of Gene Medicine, 2019). Además, otras enfermedades han sido consideradas para el uso de TG, con una distribución considerable para las enfermedades monogénicas, infecciosas, cardiovasculares y desórdenes neurológicos.

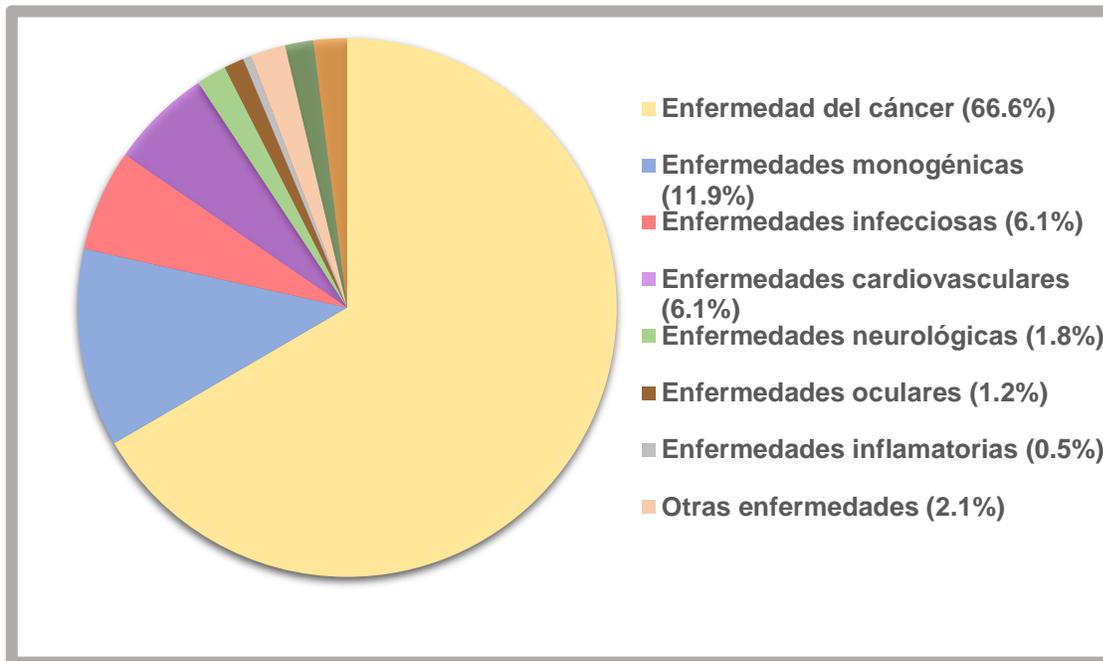


Figura 2. Enfermedades blanco en terapia génica. La gráfica muestra un conteo estadístico distribuido de los padecimientos más comunes donde se han realizado ensayos clínicos en terapia génica. Adaptado de Journal of Gene Medicine, 2019.

Para conseguir el efecto terapéutico se requiere del uso de vectores que logren transportar el o los genes de interés hacia el interior de las células. Con la finalidad de lograr dicho transporte de genes y debido a la amplia variedad de enfermedades a tratar, es importante elegir el vector que más se adecue para el tratamiento (Crystal RG 2014).

En los últimos años, se han desarrollado nuevos vectores y se han modificado aquellos existentes para permitir una liberación segura y eficiente del transgen. De forma general y en función de su naturaleza, los vectores utilizados en TG se dividen en dos grandes grupos: los vectores físicos (no virales) y los vectores virales mostrados en la **Tabla 2** (Sung and Kim, 2019) (Ghosh, S et al 2020).

Tabla 2. Tipos de vectores viales más utilizados en terapia génica. Adaptado de (Hatefi 2009)

	Vector	Immunogenic Potential	Tropism	Limitation	Major Advantage
Integrating	Retrovirus	Low	Dividing Cells only	Potential Oncogenicity	Long term gene expression in dividing cells
	Lentivirus	Low	Dividing and Non-Dividing	Potential Oncogenicity	Long term gene expression in most cells
Episomal	AAV*	Low	Dividing and Non-Dividing	Small packaging capacity	Non-inflammatory and non-pathogenic
	Herpes Simplex Virus	High	High in neurons	Transient gene expression in neurons	Large packaging capacity
	Adenovirus	High	Dividing and Non-Dividing (CAR receptor)	Viral capsid could induce immune response	Efficient transduction of most cells

(* AAVs genome exist in host as >90% episomal and <10% integrated.)

El uso de vectores virales constituye la forma más eficaz de transferir genes terapéuticos y son los vectores más utilizados en la terapia génica, ya que son capaces de infectar una elevada proporción de las células diana, es decir una elevada eficacia de transfección, que en algunos casos llega a ser del 100% (Lundstrom, 2018). Los adenovirus han sido extensamente usados como vectores para la entrega de genes exógenos dentro de células animales debido a que poseen ciertas características como un alto tropismo celular, eficiencias de transducción muy altas, una baja inmunogenicidad (para la 3ra generación llamados *helper-dependent*): títulos de producción altos con una orden de magnitud de 11 a 14, así como una alta seguridad que los hacen atractivos como vectores de transferencia génica. En la **Figura 3** se presentan los vectores más usados en pruebas clínicas para la terapia génica.

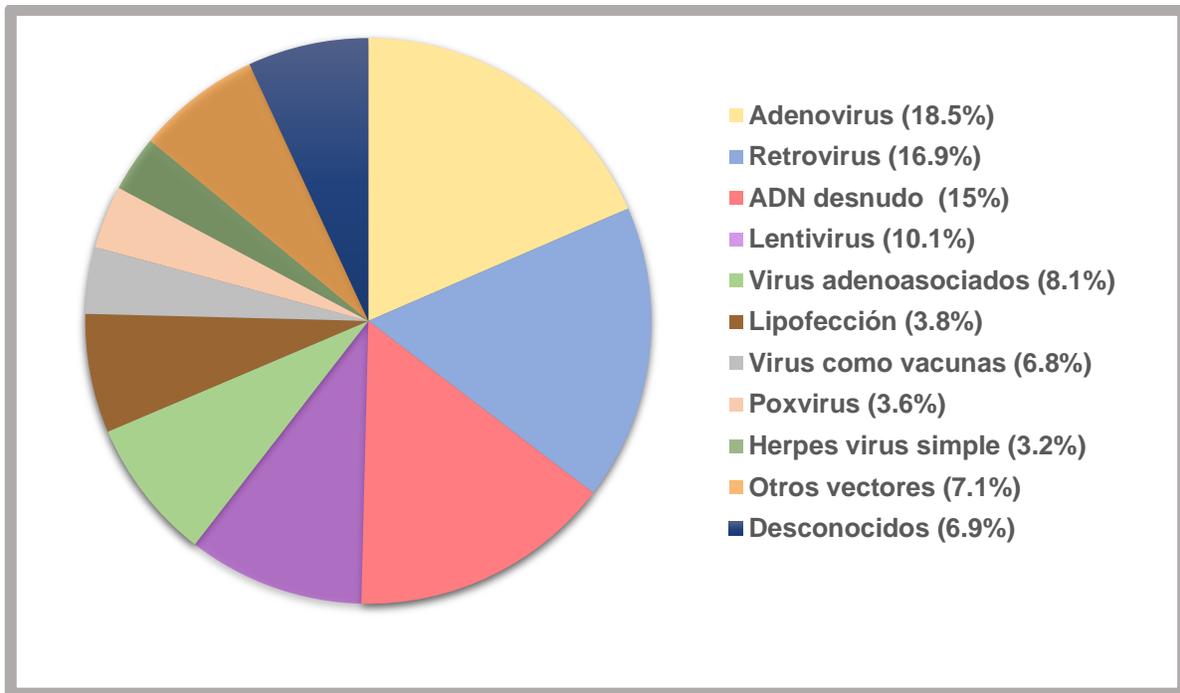


Figura 3. Vectores más utilizados en los ensayos clínicos de terapia génica. La gráfica muestra un conteo estadístico distribuido para el uso de vectores donde se han realizado ensayos clínicos en terapia génica. Adaptado de Journal of Gene Medicine, 2019.

Además, a nivel tecnológico presentan ventajas como una relativa facilidad con la que el genoma adenoviral puede ser manipulado; la posibilidad de obtener un título viral de hasta nueve o diez ordenes de magnitud en su producción; la no integración al genoma celular permaneciendo de manera episomal y, que los usados en terapia génica no presentan oncogenicidad como el Ad 5 y Ad2 (Uribe, 2014).

2.4 Adenovirus como vectores virales

Los adenovirus fueron reconocidos y aislados en 1950, a partir de un cultivo primario de células de adenoides humanas provenientes de una cepa de adenovirus humano tipo 2 (Ad2) (Rowe *et al.*, 1953).

Estos poseen un genoma de ADN de doble cadena lineal y de un tamaño que oscila entre 30,000 y 45,000 pares de bases. Presentan una cápside icosaédrica externa de 20 caras y 12 vértices, un núcleo proteico central que cubre el ADN y varias

proteínas accesorias. La cápside está conformada por tres proteínas principales: hexón, pentón y fibra, como se ilustra en la **Figura 4 (A)** (Yamamoto., Y et al 2017). En estos días, una cifra importante de estudios clínicos utiliza dichos vectores como plataforma de transferencia génica; de forma particular como adyuvantes en la terapia contra cáncer. Los objetivos principales de esta terapia son suprimir el crecimiento de células cancerosas induciendo apoptosis en ellas, inhibir la metástasis y limitar los efectos de la terapia génica a dichas células. Además, los más utilizados en terapia génica han sido deletados en la región temprana E1, ver **Figura 4 (B)**, encargada de la replicación, por lo que estos vectores son considerados virus no replicativos en células humanas, aunque podría ser el caso solo si son producidos en células que le brinden ciertas proteínas para su replicación como el caso de las células HEK293 (Meneses, 2008; Uribe, 2014).

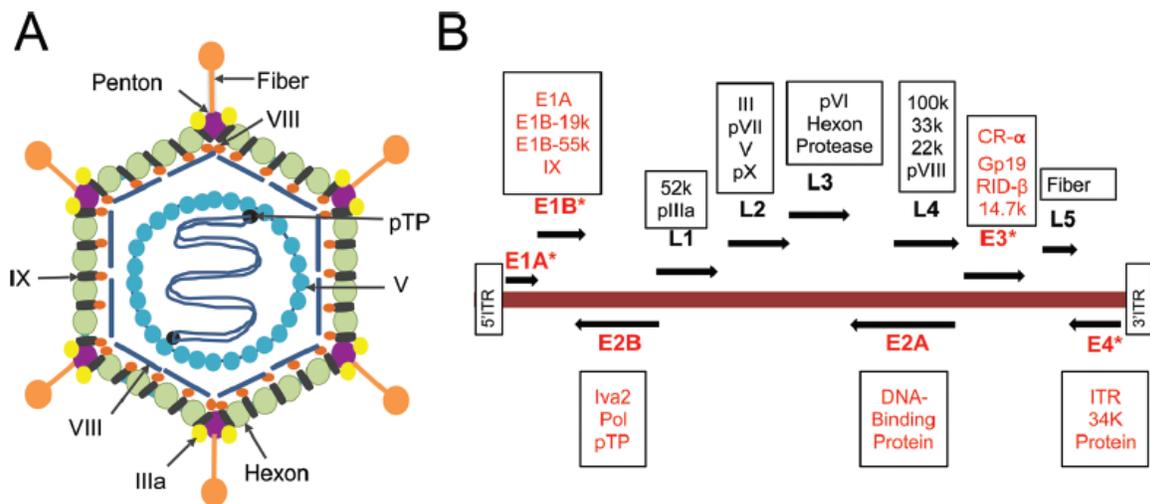


Figura 4. Estructura del adenovirus y su organización genómica. A. Representación gráfica de la estructura del adenovirus y sus proteínas integrales. B. Organización genómica del adenovirus con transcritos tempranos y tardíos y proteínas codificadas para cada uno. Las regiones en rojo con * están deletadas en varios vectores adenovirales. Las regiones E1 y E3 fueron deletadas en la primera generación, y las regiones E1, E2 y E3 fueron deletadas en la segunda generación e vectores adenovirales (Adaptado de Singh *et al.*, 2018).

Dichos vectores defectivos fueron producidos hace ya algunos años mediante la inducción de transformación de células embrionarias de riñón humano, donde la

región E1 del genoma del Ad5 fue incluida al genoma de tales células, dando como resultado el linaje celular HEK293 (Graham *et al.*, 1977).

Actualmente esta línea celular se utiliza para la producción de productos recombinantes como el caso de diversos tipos de adenovirus de primera, segunda y tercera generación o como hospedero para otro tipo de vectores como lentivirus, retrovirus, usados en terapia génica (Uribe, 2014).

El mecanismo por el cual estas partículas adenovirales se replican dentro de un hospedero es mediante la interacción y unión de las fibras presentes en su estructura con proteínas contenidas en las membranas celulares llamadas CAR (por sus siglas en inglés, Receptor Adenoviral Coxsackie), donde se facilita la unión de la pentona con proteínas epiteliales del tipo integrinas αv ($\alpha v\beta 5$ y $\alpha v\beta 3$) para que posteriormente la partícula se internalice vía endocitosis. Una vez adentro, se desensambla del endosoma para que las pentonas, proteínas IIIa y VIII se disocien y la proteína VI se degrade por la proteasa vírica y se liberen las nucleoproteínas hacia el citosol y así llegar al núcleo para generar la expresión génica (Singh *et al.*, 2018).

2.5 Formulaciones en la terapia génica de cáncer pulmonar.

Además de la administración de moléculas pequeñas en vectores no virales, varios autores han propuesto el alto potencial de la liberación pulmonar para la entrega de genes terapéuticos mediante vectores virales con la finalidad de tratar y/o curar la enfermedad de forma local, desde el tracto respiratorio hasta los pulmones (Javadzadeh, Y., & Yaqubi, S., 2017).

Dichos vectores han sido desarrollados y evaluados para formulaciones que mejoran la estabilidad fisicoquímica de estos en la terapia génica. Donde se utilizan distintas sustancias como soluciones amortiguadoras o excipientes farmacéuticos que coadyuvan al mantenimiento de este bajo ciertas condiciones al momento de su formulación. El objetivo de los sistemas de liberación para vectores adenovirales en los últimos años se basan en producir una expresión transgénica con la máxima

seguridad y eficacia. Además, los aspectos moleculares y biológicos del vector pueden contribuir simultáneamente a dichos objetivos, así como afectar significativamente la estabilidad fisicoquímica, de tal forma que conforme el vector se va degradando, la eficiencia de transducción cae y la efectividad va disminuyendo. De igual forma, si los productos de degradación son tóxicos e inmunogénicos, la seguridad de la preparación también se ve comprometida. Es por lo anterior que, la preparación de formulaciones óptimas que mejoren la estabilidad fisicoquímica del vector se orienta a la prevención de la degradación, aseguren la viabilidad y efectividad de la transducción de estos (Barry 2020).

Hasta ahora, diversas formulaciones reportadas en la literatura se han enfocado en la adición de excipientes para mejorar la eficiencia de transducción *in vivo*, basadas en vectores adenovirales, formulados empleando el proceso de liofilización. En la **Tabla 3** se muestra una lista de excipientes que se han utilizado en formulaciones adenovirales con la finalidad de otorgar estabilidad y seguridad a dicha formulación. Sin embargo, el desarrollo de novedosas estrategias de formulación sigue siendo materia de estudio (Croyle *et al.*, 2008; Kamerzell *et al.*, 2011).

Tabla 3. Lista de excipientes utilizados en formulaciones adenovirales.

Excipiente	Función	Concentración	Referencia
Sacarosa: manitol	Estabilizante de la cápside viral/ almacén, osmolítico (PDI<0.5) (Crioprotector)	1:4 %/ sacarosa 5%	Evans RK, Nawrocki DK, Isopi LA, et al. Development of stable liquid formulations for adenovirus- based vaccines. J Pharm Sci.
MgCl ₂	Catión divalente	NA	
Polisorbato 80 (Tween® 80)	Tensoactivo no iónico	0.005 – 0.1 %	
EDTA	Agente quelante, estabilizante del DNA plasmídico	0.1 mM	
Etanol	Inhibidor de la oxidación, eliminador de radicales libres, inactivante adenoviral	0.5% (v/v)	
Histidina	Inhibidor de la oxidación	10 mM	

Arginina (Arg)	Aminoácido básico	0 – 30 g/L	2004;93:2458-2475. Kamerzell T. 2011. Protein–excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. Advanced Drug Delivery Reviews 63; 1118–1159
Alanina (Ala)	Osmolítico	0 – 20 g/L	
Glicina (Gly)	Osmolítico	0 – 20 g/L	
Lisina (Lys) - HCl	Aminoácido básico	0 – 30 g/L	
Histidina (His)	Aminoácido buffer, eliminador de radicales,	3 – 30 g/L	
Triptofano (Trp)	Inhibidor de radicales libres	0 – 7 g/L	
Glutamina (Glu)	Osmolítico	0 – 10 g/L	
Metionina (Met)	Antioxidante	0 – 1.5 g/L	
Trehalose	Estabilizante	27 % w/v	
Glutamato sódico	Estabilizante	0.05 %	
Tris-HCl	Estabilizante	20 mM	

Estas formulaciones tanto convencionales como no convencionales dirigidas hacia el tratamiento del cáncer, carecen de especificidad, atacando tanto a células dañadas como sanas, es decir estos tratamientos atacan a células con una alta tasa de reproducción, tal es el caso de las células dañadas “cancerígenas” al igual que células de la piel, cabello, uñas, entre otras. Por lo que los efectos adversos asociados al tratamiento no son nada favorables para el paciente e incluso va degradando la salud de este a causa de estos efectos. Así, el desarrollo de la terapia génica como una alternativa a la sustitución de la quimioterapia, ha dado una alta expectativa con diversos estudios realizados haciendo uso de vectores virales para la entrega de genes exógenos. Sin embargo, las vías de administración reportadas en estudios son la intratumoral o la parenteral como infusiones intravenosas, por lo que no son muy aceptables y además de que son vías invasivas (Ura T, et al 2014).

Recientemente se han observado mejoras significativas en la ingeniería, administración y seguridad de vectores virales, destacando a los vectores virales recombinantes no replicativos como vanguardistas de la medicina moderna, colocándolos en los pioneros para vacunas y terapia génica. Además, este tipo de vectores se han utilizado recientemente para el tratamiento de diversas enfermedades tales como enfermedades metabólicas, cardiovasculares, musculares, hematológicas, oftalmológicas e infecciosas, así como diferentes tipos de cánceres. Así mismo se han desarrollado enfoques preventivos y terapéuticos en el área de la inmunoterapia, mientras que los estudios preclínicos y clínicos demostraron la eficacia terapéutica y profiláctica de los vectores virales. Mientras tanto, varios medicamentos basados en vectores han sido aprobados a nivel mundial (Lundstrom K., 2018).

Según lo revisado por Rollier et al., Lundstrom et al., y Ura et al., entre el 2018-2019 se han evaluado muchas especies virales como vehículos de administración de genes recombinantes en los campos de vacunas y terapia génica, haciendo uso de retrovirus, lentivirus, flavivirus, virus vaccinia (virus vaccinia Ankara modificado), adenovirus (Ad), virus asociados (AAV), citomegalovirus, virus de Sendai, virus del sarampión, virus del herpes simple, rabdovirus (virus de la estomatitis vesicular) y picornavirus.(Ura 2014).

Sin embargo, hasta la fecha, los vectores más evaluados son el adenovirus serotipo 5 (Ad5), los serotipos AAV 2, 3, 5, 6, 8, 9 y miembros de la familia de los poxvirus, por ejemplo, el virus vaccinia, particularmente el virus vaccinia Ankara modificado. Un inconveniente asociado con la fabricación, el almacenamiento y la distribución es que los vectores virales son conjuntos supramoleculares complejos de macromoléculas que son propensas a una variedad de vías de degradación química y física. Un factor de riesgo importante para la estabilidad de las formulaciones de vectores virales es la pérdida de la integridad de la partícula viral y la infectividad (Ura T, et al 2014; Mateu MG, 2011).

2.6 Vía inhalatoria o pulmonar como ruta de administración.

La vía pulmonar se define como aquella ruta por la cual se administran medicamentos a través de los principales órganos (nariz y boca) para lograr llegar a los pulmones y sus ramificaciones mediante inhalación con la finalidad de generar el efecto a lo largo de estos. Inicialmente esta vía fue implementada para tratar enfermedades respiratorias y actuar como efecto local. Además, la administración de medicamentos por esta vía ofrece grandes ventajas en el tratamiento de enfermedades respiratorias en comparación de las demás vías como evitar el metabolismo de primer paso, una alta absorción debido a la gran irrigación sanguínea y la posibilidad de generar efectos locales y sistémicos (Joshi., M. D., et al. 2019).

Desde el siglo XIX el uso de la vía inhalatoria para la administración de fármacos o moléculas ha sido cada vez más habitual, donde se ha observado que esta vía se emplea para tratar en su mayor parte, enfermedades del tracto respiratorio, buscando comúnmente un efecto local. Las ventajas que se tienen reportadas cuando se aplican medicamentos por esta vía son: una acción rápida del efecto en el sitio de acción específico, por lo que los efectos secundarios se minimizan debido a que la concentración del activo queda en el sitio local y por ende no va hacia circulación sanguínea. Esta vía ha presentado un potencial elevado para la administración de diferentes tipos de fármacos, como los β agonistas y anticolinérgicos para la broncodilatación en enfermedades tales como asma, bronquiectasia, bronquiolitis; glucocorticoides en tratamiento de asma, bronquiectasia, bronquiolitis; antibióticos para la prevención del *Pneumocystis pneumonia* y tratamiento de virus respiratorios sincitiales, fibrosis quística, bronquiectasia, diversos tipos de cáncer, entre otros (Rubio, 2018).

Con la finalidad de conocer y controlar los procesos por los cuales las formulaciones administradas por esta vía se llevan a cabo, es importante identificar la anatomía normal los pulmones. La función principal conocida del sistema respiratorio es

coordinarse con el sistema circulatorio para suministrar el oxígeno del medio exterior hacia las células del cuerpo, para lograr el intercambio gaseoso y expulsar el dióxido de carbono del cuerpo (Amararathna et al., 2019). Los pulmones son órganos pertenecientes al sistema respiratorio y pueden dividirse en dos componentes principales: las vías aéreas conductoras, que consisten en la tráquea, los bronquios y bronquiolos para transportar aire del tracto respiratorio superior a la periferia del pulmón y el parénquima, incluidos los alvéolos, donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso. A su vez, éste se puede dividir en dos secciones: el sistema respiratorio superior que incluye la cavidad nasal, los senos paranasales y faringe, mientras que la laringe, la tráquea, los bronquios y los bronquiolos comprenden el tracto respiratorio inferior como se muestra en la **Figura 5**.

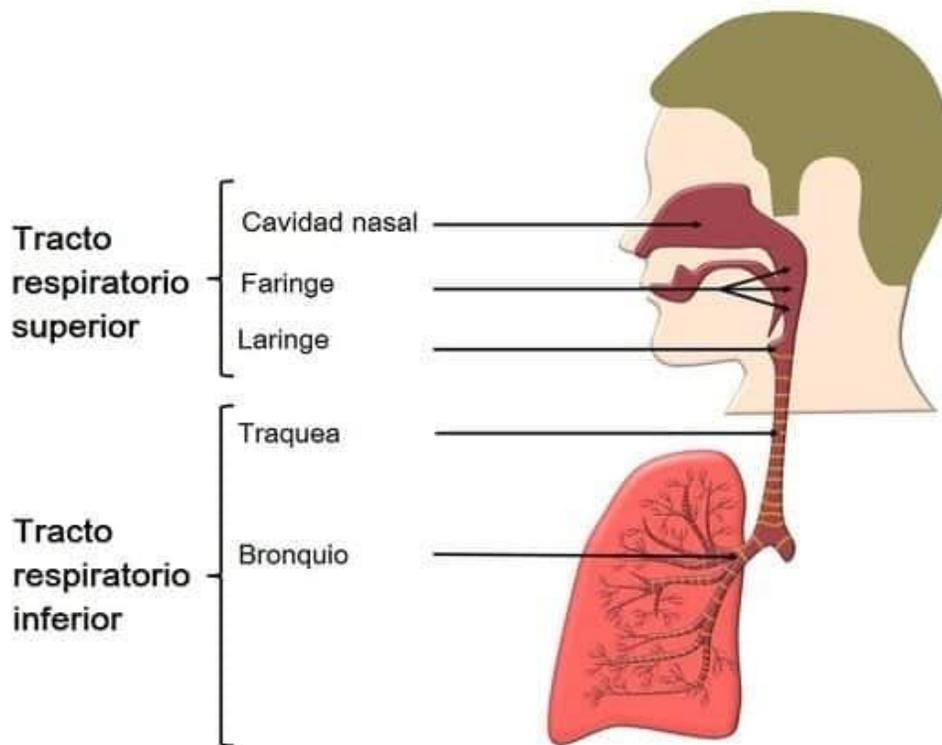


Figura 5. Anatomía del sistema respiratorio.

La primera línea de defensa de este sistema contra partículas que pueden ser inhaladas son: la nariz y los senos paranasales a través de la filtración, estructura irregular de los huesos nasales y la mucosa. Posteriormente, en la parte terminal de la tráquea se generan dos divisiones, los bronquios principales derecho e izquierdo.

Cada uno de estos da lugar a lóbulos y bronquios segmentarios, donde la rama de los bronquios se ramifica progresivamente en los bronquiolos. A su vez, estos últimos terminan en el acino, que es acompañado por una red capilar responsable del intercambio de gases y contiene conductos alveolares, sacos alveolares y los alvéolos (Katz et al., 2019).

Además, el pulmón como órgano diana para diversos enfoques terapéuticos, ofrece otras diversas características beneficiosas como; un área superficial bastante amplia con hasta cientos de metros cuadrados (aprox. 140 m²), una gran irrigación sanguínea de hasta 5 litros por minuto, con hasta 0.25 litros de sangre en los capilares pulmonares, una longitud del epitelio extremadamente delgado de entre 0,1-0,2 µm, también esta vía se vuelve muy atractiva debido a una relativamente baja actividad enzimática y aclaramiento superficial lento (Kandil y Merkel, 2019).

Con base en la ubicación y función de esta vía, la región pulmonar es bastante susceptible a diversas enfermedades específicas, ya que ésta permite la entrada directa a sustancias nocivas. Dichos trastornos contribuyen a la gran carga mundial de morbilidad con respecto a la salud pública, en materia de patologías como el asma, la fibrosis pulmonar idiopática, el virus sincitial respiratorio y, además, el cáncer de pulmón como la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial, la causa subyacente es la transcripción elevada de ciertos genes (Bray et al., 2018)

La **Figura 6** representa algunos métodos de administración que pueden utilizarse para administrar genes a los pulmones tales como; la inhalación, la instilación intranasal, la instilación intratraqueal y la intubación intratraqueal (T. Wan., Y. Ping., 2020). Entre ellos, la administración de genes no invasivos a los pulmones mediante complejos de vector/pADN en aerosol para inhalación se considera la mejor opción, ya que permiten concentraciones locales elevadas en las vías respiratorias y administración sin dolor y sin aguja. No obstante, se ha demostrado que solo unos pocos vectores virales y no virales protegen eficazmente el pDNA de las fuerzas de cizallamiento generadas durante el proceso de aerolización (Villate et al., 2015).

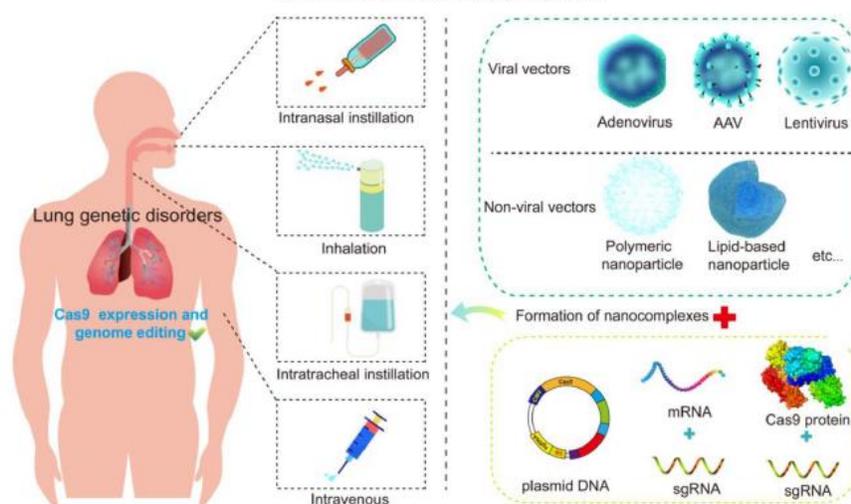


Figura 6. Administración pulmonar de agentes terapéuticos de edición del genoma mediada por vectores virales o no virales. Existen 3 formatos disponibles para la entrega de Cas9 / sgRNA: ADN plasmídico que codifica Cas9 / sgRNA, mRNA y sgRNA de expresión de Cas9, y proteína Cas9 complejada con sgRNA (ribonucleoproteína). El tamaño del plásmido Cas9 es típicamente superior a 7 kb con la adición de la cadena principal del plásmido y otros elementos auxiliares de expresión. Cas9mRNA y sgRNA generalmente se producen mediante transcripción *in vitro* utilizando moldes de ADN, que son impulsados por el promotor T7 para la transcripción. Cas9 RNP es una complejación que comprende una proteína Cas9 cargada positivamente y un sgRNA cargado negativamente. Además, actualmente se encuentran disponibles dos tipos de vectores de administración de genes clínicamente relevantes para administrar agentes terapéuticos al pulmón, a saber, vectores virales y vectores no virales. Puede usarse la ruta de instilación e inhalación intravenosa, intratraqueal / intranasal para administrar agentes terapéuticos de edición del genoma a los pulmones de un ser humano (Modificado de T. Wan., Y. Ping., 2020).

2.6.1 Deposición pulmonar de partículas.

El uso de esta vía en la terapia de diversas enfermedades continua en estudio y se ha reportado que al momento de administrar medicamentos o formulaciones multiparticuladas, debido a la dependencia del tamaño promedio de las partículas inhaladas con la zona de los pulmones que se alcanza.

Las partículas que son suministradas por inhalación pueden depositarse en las diversas ramificaciones pulmonares en función de 5 mecanismos diferentes, los

cuales son dependientes por el diámetro de masa media aerodinámica (MMAD por sus siglas en inglés; el cual es el diámetro en el que el 50% de la masa del aerosol es más pequeña y el otro 50% es más grande que el parámetro mencionado), la velocidad del flujo de aire y la ubicación en el sistema respiratorio. Estos mecanismos son impactación, sedimentación, intercepción, fuerza electrostática o difusión browniana, la **Tabla 4** presenta los efectos del tamaño de partícula en el sitio de depósito dentro del tracto respiratorio, descritos a continuación (Amararathna *et al.*, 2019; Andrew *et al.*, 2021):

Impactación. Este mecanismo se observa generalmente para inhaladores de polvo seco (PDI) e inhaladores de dosis medidas (MDI), con MMAD mayores a 5 μm , en donde las partículas de aerosol pasan a través de la orofaringe a alta velocidad y con suficiente impulso que, cuando entra a las vías respiratorias se mantiene su trayectoria sin importar como vaya cambiando la dirección de la corriente de aire, chocando así con la pared respiratoria y depositándose en las regiones de la orofaringe.

Sedimentación. En este mecanismo la fuerza gravitacional es la responsable de la deposición de las partículas, ya que va a depender de las maniobras de respiración del paciente para que las partículas tengan mayor tiempo para sedimentarse, por ejemplo, conteniendo la respiración, esto ocurre principalmente en la región de los bronquiolos, aunque algunas veces también pueden llegar hasta los alvéolos, se da principalmente con partículas con MMAD entre 0.5 y 5 μm (Fernández y Clara 2012; Andrew, 2021).

Difusión. En este mecanismo los movimientos brownianos son los responsables de la deposición de las partículas. Las moléculas que están en el tensioactivo pulmonar acuoso provocan un movimiento aleatorio de las partículas cuando entran en contacto con dichas moléculas, dando lugar a la difusión de la partícula en la región alveolar, esto ocurre a partículas con MMAD menores a 0.5 μm .

Fuerza electrostática. Este mecanismo se da cuando las partículas poseen carga opuesta a la que se presenta en las vías respiratorias

Intercepción. Este mecanismo implica que la deposición se da cuando una partícula presenta forma alargada o de fibra y uno de sus extremos toca la pared de

las vías respiratorias, principalmente influenciado por la fuerza de gravedad (Fernández y Clara 2012; Andrew, 2021).

Tabla 4. Distribución y deposición de partículas en el sistema respiratorio basado en el tamaño de partícula MMAD (Amararathna et al., 2019).

Tamaño de partícula (μm)	Ubicación	Método de deposición
>10	Región orofaríngea	Impactación
5-10	Grandes vías aéreas conductoras Región orofaríngea	Impactación inercial
1-5	Pequeñas vías aéreas Alveolos	Sedimentación gravitacional
<3	Vías aéreas inferiores Alveolos	Sedimentación Difusión
0.1 - 1	Vías aéreas inferiores Alveolos	Difusión
<0.1	Vías aéreas periféricas Alveolos	Difusión
<0.01	Región respiratoria superior	-

El MMAD de las partículas inhaladas es de gran importancia dado que de esto dependerá la deposición de estas al ingresar al organismo, en la **Figura 7** se observa donde se impactará la partícula conforme al tamaño de la partícula, así como su mecanismo de deposición.

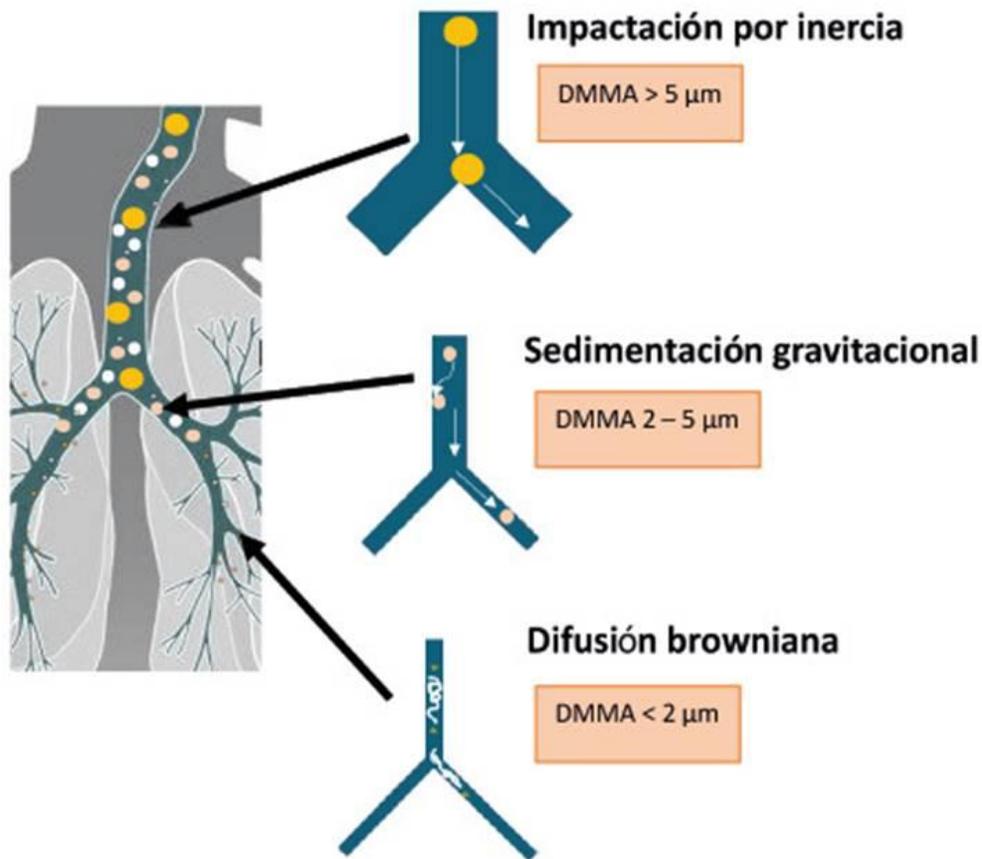


Figura 7. Tipos de deposición de partículas más comunes. Adaptado de Fisiología pulmonar DMDR M.D.

2.6.2 Formulaciones para la terapia por inhalación.

Como se mencionó anteriormente, para el cáncer pulmonar y otras enfermedades se ha observado que la administración local de fármacos en el órgano objetivo ofrece enormes beneficios, como la acumulación preferencial en el tejido, órgano, célula u organelo diana.

Para el problema de estudio de este proyecto, el cáncer pulmonar, la vía inhalatoria representaría la mejor opción. Esta vía no es invasiva, produce una alta biodisponibilidad a una dosis baja y evita el metabolismo de primer paso (Nazrul & Derek, 2019).

La administración pulmonar de medicamentos se ha dado a partir de formulaciones como los polvos secos para inhalación (DPI), los nebulizadores ultrasónicos y los inhaladores de dosis medida (MDI). Entre ellos han destacado los polvos secos para inhalación debido a su estabilidad química, fácil manejo, con alto grado de alcance de la formulación en los pulmones, con manufactura menos costosa y sin la necesidad de propelentes o fuentes externas de energía. Los inhaladores de polvo seco son dispositivos que permiten la aerolización y entrega de medicamentos hacia los pulmones en forma de polvo seco. Se caracterizan por ser de fácil manejo, portátiles y duraderos, además este tipo de dispositivos requieren una mínima coordinación entre la respiración del paciente y la actuación del inhalador, es por ello que han sido seleccionados como forma farmacéutica para el desarrollo de este proyecto. Por su parte, los MDI consisten en una formulación que contiene el fármaco disuelto o resuspendido en un propelente o una mezcla de diversos, además, se incluyen agentes amortiguadores, conservadores, saborizantes y la sustancia activa que se emplea, lo que comprende cerca del 1% del contenido total. Dicha formulación permite la entrega de dosis eficiente y consistente al paciente (Jin, X., et al 2020).

Existen excipientes aprobados y utilizados para el desarrollo de formulaciones para cada uno de los tipos antes mencionados, los cuales se presentaron anteriormente en la **Tabla 3** (Pilcer *et al.*, 2010; Javadzadeh, Y., & Yaqoubi, S., 2017). Las formulaciones se basan en sistemas multiparticulados con tallas micro-nanométricas para alcanzar las zonas bajas aéreas como, por ejemplo, los vectores no virales: nanopartículas poliméricas, nanopartículas sólidas lipídicas, liposomas, dendrímeros, nanocápsulas, nanoemulsiones etc., destacando una selectividad por el tejido diana y nuevas propiedades físico químicas y biológicas mejoradas (Alcalá *et al.*, 2014; Javadzadeh, Y., & Yaqoubi, S., 2017).

Como se mencionó al inicio, la función principal de los pulmones es la respiración. Para cumplir con dicho propósito, estos órganos tienen una gran superficie y membranas delgadas. Al momento de llevar a cabo formulaciones para ser

administradas por esta vía, algunos excipientes utilizados pueden incluso llegar a dañar los pulmones (Telko y Hickey, 2005; Metz *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2018). En este sentido, algunos polímeros como la metilcelulosa, crospovidona o los tensoactivos aniónicos que generalmente se usan en formulaciones orales, no pueden administrarse a los pulmones debido a su naturaleza no degradante o irritante. Cabe señalar que los excipientes actuales aprobados por la FDA para la administración de medicamentos o moléculas por la vía inhalatoria son muy limitados en número y no se aceptan en todo el mundo. Los excipientes aceptados en las formulaciones de nebulización e inhaladores de dosis medida (MDI por sus siglas en inglés), tales como polisorbatos, trioleato de sorbitán o ácido oleico no están muy extendidos en el desarrollo de inhaladores de polvo seco (DPI's por sus siglas en inglés) debido a su bajo punto de fusión y su estado semisólido o líquido.

La **Tabla 5** muestra un resumen de los excipientes ya aprobados para las formulaciones de DPI con un alto impacto de uso. El conjunto de excipientes potenciales está limitado a compuestos que son biocompatibles o endógenos para el pulmón y que pueden metabolizarse o eliminarse fácilmente. Si las partículas se depositan en las vías respiratorias conductoras, se eliminan mediante el barrido mucociliar, donde las partículas se eliminan en 24–48 h según el número de cilios y su frecuencia de latido. En los bronquiolos y alvéolos, las partículas se eliminan por absorción directa a través de las células epiteliales o por los macrófagos alveolares (Dalby *et al.*, 1996; Metz, *et al.*, 2020).

Tabla 5. Lista de lactosas grado inhalación disponible comercialmente (Plicer *et al.*, 2010).

NOMBRE COMERCIAL	DESCRIPCIÓN	D (0.5) (μm)	D (0.9) (μm)
Respitose ML001 (DMV-Fonterra)	Monohidrato de lactosa molido con PSD amplio	55	170
Respitose ML006 (DMV-Fonterra)	Lactosa molida fina monohidratada con PSD estrecha	17	45

Respitose SV003 (DMV-Fonterra)	Tamizado lactosa monohidrato con PSD estrecho	60	100
Respitose SV010 (DMV-Fonterra)	Lactosa tamizada gruesa monohidratada con PSD amplia	105	175
Lactohale 100 (Domo) Sieved	Lactosa monohidratada con PSD estrecho y partículas en forma de hacha de guerra con superficie lisa	125 – 145	200 - 250
Lactohale 200 (Domo)	Lactosa monohidratada suavemente molido con partículas de forma irregular	50 - 100	120 – 160
Lactohale 201 (Domo)	Lactosa monohidratada apenas molido con partículas de forma irregular	50 - 100	120 – 160
Lactohale 300 (Domo)	Lactosa monohidratada micronizada con PSD estrecha	<5	<10
Inhalac 70 (Meggle)	Lactosa cristalina tamizada con PSD estrecha	200	300
Inhalac 120 (Meggle)	Lactosa cristalina tamizada con PSD estrecha	150	200
Inhalac 230 (Meggle)	Lactosa cristalina tamizada con PSD estrecha	100	140
Anhydrous 120 MS (Sheffield Pharma Ingredients)	Lactosa anhidra tamizada	-	-
Monohydrate 120 MS (Sheffield Pharma Ingredients)	Lactosa monohidratada tamizada	-	-
Anhydrous 40M (Sheffield Pharma Ingredients)	Lactosa anhidra molida	-	-
Monohydrate 40M (Sheffield Pharma Ingredients)	Lactosa monohidratada molida	-	-
Monohydrate 80M (Sheffield Pharma Ingredients)	Lactosa monohidratada molida	-	-
Monohydrate 120M (Sheffield Pharma Ingredients)	Lactosa monohidratada molida	-	-

D (0.5) es el tamaño de partícula por debajo del cual se encuentra el 50% de la muestra (diámetro medio del volumen) y D (0.9) es el tamaño de partícula por debajo del cual se encuentra el 90% de la muestra. PSD: Distribución del tamaño de partícula.

En la actualidad, la lactosa es el excipiente más comúnmente utilizado en DPI's comercializados como (Beclophar®, Flixotide®, Relenza®, Seretide®, Spiriva®, Symbicort®). Además, ha mostrado un perfil de seguridad y estabilidad bien caracterizado, con controles sobre la pureza y propiedades físicas; este excipiente se encuentra fácilmente disponible en diferentes grados y es económico (Smyth y Hickey, 2005).

Desde hace ya varios años, se ha reportado que partículas finas de lactosa que llegan a los pulmones, son rápidamente absorbidas y metabolizadas por el epitelio intestinal y se excretan principalmente en la orina (Clark *et al.*, 1974; Obadi *et al.*, 2021).

Además, diferentes reportes establecen que, en contraste con la administración oral, es poco probable que la lactosa ingerida a los niveles presentes en las preparaciones inhaladas de hasta 25 mg presente problemas incluso en pacientes con intolerancia a la lactosa. Como se puede mostrar en la **Tabla 5**, la mayoría de los medicamentos o moléculas formuladas en DPI's que se encuentran en el mercado dependen de la lactosa como material portador, además de que los fabricantes utilizan diferentes formas físicas de lactosa para la inhalación, como el monohidrato de lactosa o la lactosa anhidra, obtenidas por diversas técnicas como la molienda o el secado por pulverización y, las cuales presentan una amplia gama de distribución del tamaño de partícula (Hebbink, G.A et al 2022; Plicer et al., 2010).

Además, se sabe que las terapias actuales para las enfermedades relacionadas al cáncer pulmonar implican tanto fármacos de molécula pequeña como macromoléculas biológicas como péptidos, proteínas y vectores tanto virales como no virales. Las vías de administración convencionales incluyen principalmente las vías oral y parenteral, que adolecen de limitaciones tales como una distribución terapéutica insuficiente en el sitio de destino y las toxicidades resultantes desde una estrecha ventana terapéutica. Sabiendo que algunas enfermedades exigen la administración repetida durante un período relativamente largo, es importante el uso de diversas estrategias con la finalidad de mejorar la eficacia del tratamiento

umentando la concentración terapéutica en el sitio objetivo y disminuir la exposición sistémica, beneficiando el resultado terapéutico. Además, entregando medicamentos por vía pulmonar ofrece una oportunidad única de reutilizar medicamentos para el tratamiento de enfermedades respiratorias. Newman SP contribuyó con una revisión exhaustiva sobre la historia de la reutilización de fármacos en el tratamiento de enfermedades respiratorias por vía pulmonar, señalando el papel fundamental de la reutilización en comparación con el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Newman SP., et al 2018).

En la actualidad se utilizan diversos medicamentos por esta vía para combatir enfermedades infecciosas como el Zanamivir, un inhibidor de la neuraminidasa, que se usa para tratar y prevenir la influenza A y B. Zanamivir (10 mg por inhalación usando Diskhaler® DPI dos veces al día) es clínicamente bien tolerado y puede acortar la duración de las enfermedades sintomáticas (Cheer, S.M., et al 2002).

En un estudio reciente, Liao et al. formularon tamibaroteno en forma de polvo seco inhalable que presentó una estrategia prometedora para combatir diversas infecciones virales respiratorias, incluidos el SARS-CoV-2, la influenza y el MERS-CoV (Liao QY., et al 2021).

Para los pacientes con alto riesgo de neumonía, se administró inhalación de pentamidina para prevenir la infección (Quinn M., et al 2018). Desde finales de la década de 1990, se ha desarrollado la tobramicina inhalada para el tratamiento de infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (Ramsey, BW., et al 1999; Geller, D.E., et al 2011).

Con los avances en los dispositivos inhaladores, se han desarrollado continuamente formulaciones innovadoras, por ejemplo, solución de tobramicina a través de un nebulizador de malla vibratoria, formulación de polvo seco a través de DPI de dosis unitaria y partículas PulmoSphere® a través de un nebulizador de chorro (Griese M., et al 2014).

3 ANTECEDENTES

Determinación de la LC₅₀ de Ad5/NPv30-3 en cultivos de A549.

Reportes hechos por Rodríguez- Maxines CA y Rodríguez Cruz, E., (2017, 2018) se basaron en determinar la LC₅₀ del vector Ad5/NPv30-3 sobre la línea celular A549 con la finalidad de ser candidato a posible biofármaco en terapia génica contra cáncer de pulmón. Por lo que es un estudio que ha venido marcando el camino en cuanto al uso de este vector como posible tratamiento. Existen diversos métodos para determinar la LC₅₀ basados en la forma de la distribución de las tolerancias, como el porcentaje de células afectadas bajo ciertas dosis. Algunos de los más comunes son; método Probit (paramétrico), método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico), Spearman- Karber (no paramétrico) y el método gráfico de Gamez Rojas, 2008. En el presente estudio se realizó el método Probit, aplicando las correlaciones estadísticas basado en una distribución logarítmica de la relación concentración-respuesta (MOI- mortalidad) sobre el modelo A549 *in vitro*.

Previamente se evaluó la viabilidad de las células A549 por el método de exclusión con azul de tripano con la finalidad de determinar el efecto que produce la transducción con el vector Ad5/NPv30-3. En la **Figura 8** se presentan los resultados, donde se observa que conforme aumenta la MOI la viabilidad decae, es decir, se observa una proporcionalidad inversa con estos dos parámetros, con valores para MOI de 10 con una viabilidad del 74% comparado con un 37% cuando se utiliza una MOI de 50, siendo estadísticamente significativo considerando la viabilidad del control 1.

Por lo que se confirma lo previsto por Sánchez, U.A en 2017., donde observa la proporcionalidad directa entre la muerte celular y la MOI utilizada (Rodríguez, E., en 2018).

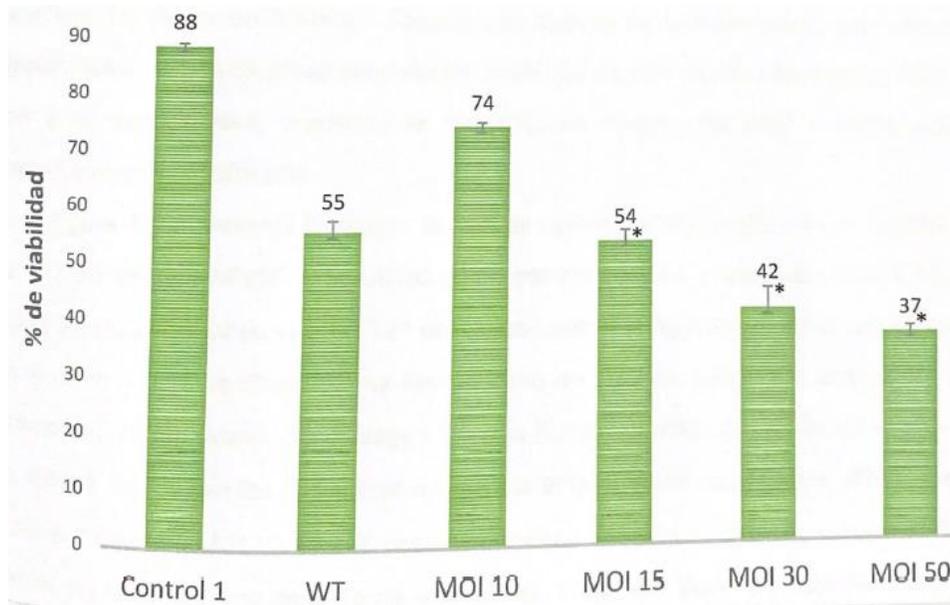


Figura 8. Porcentaje de viabilidad de las células A549: con azul de tripano en cultivos sin infectar. (control 72 horas) y post-transducción con Ad5/NPv30-3 (MOI 10, 15, 30 Y 47) Análisis estadístico ANNOVA y Tukey, n=4 y p<0.05. Tomado de Cruz, E., 2017.

De acuerdo con los datos mostrados en la **Tabla 6** donde se resumen los valores de LC_{50} según el método de determinación de la viabilidad por azul de tripano cuyo valor fue de 23.68 virus por célula mientras que por el método MTS se requiere de una MOI de 23.77 virus/ célula.

De acuerdo con el estadístico Probit, se obtiene que los valores antes mencionados son los determinados en cuanto a la elucidación del comportamiento. Además, se propone el primer mecanismo de MCP dado que tiene un patrón mixto (apoptosis/ autofagia). Dicho lo anterior, se da el parteaguas al desarrollo continuo con respecto al vector Ad5/NPv30-3 y la LC_{50} , así como una posibilidad de estudiar el mecanismo de acción (Rodríguez, E., en 2018).

Tabla 6. Determinación LC_{50} con el método estadístico Probit (adaptado de Cruz, E., 2017)

Método de determinación de viabilidad	LC_{50} (virus/ célula)
MTS	MOI 23.77
Azul de tripano	MOI 23.68

4 JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de nuevas formulaciones es actualmente un tema de interés para proponer mejoras a los tratamientos de enfermedades de interés nacional e internacional, como el cáncer de pulmón, en el que, por el tejido, su naturaleza y el difícil acceso, limita el establecimiento de tratamientos eficaces. Dado que el índice de mortalidad de este padecimiento es muy alto y que se ha observado que los tratamientos ya establecidos son poco beneficiosos, como la quimioterapia y radioterapia, es necesario desarrollar tratamientos dirigidos de manera molecular como la Terapia Génica, donde los vectores adenovirales han mostrado grandes ventajas; ya que permiten hacer modificaciones genéticas en la célula dañada y reconstituir la función, potenciar la respuesta inmunológica o inhibir a nivel de RNAi la generación de mensajeros peligrosos. Por otro lado, elección de la ruta de administración de un medicamento es esencial para determinar su eficacia, lamentablemente, muchas enfermedades, incluido el cáncer, cuentan con formulaciones que son administradas por vías que generan un efecto sistémico y con ello un gran número de efectos no deseados. Esto hace necesario contar con terapias más dirigidas y localizadas, como, por ejemplo, para el cáncer pulmonar, una vía de administración por inhalación representaría ventajas en la seguridad y eficacia, menos costos, y una mejor calidad de vida para los pacientes que lo padecen, ya que es una ruta no invasiva e indolora.

Es por lo anterior, que el uso de estrategias terapéuticas novedosas como la terapia génica en conjunto con el desarrollo integral de una formulación inhalable que puede acarrear dicho biofármaco, permitirá llevar al vector adenoviral a la célula hospedera blanco y ser introducido en ella para llevar a cabo su función. En este proyecto se buscó desarrollar, obtener y caracterizar una formulación inhalable de una partícula adenoviral que exprese la proteína NPv30-3, la cual ha demostrado tener efecto citotóxico específico *in vitro* contra células de cáncer pulmonar, la cual pueda ser administrada por la vía pulmonar como estrategia génica potencial para el tratamiento esta enfermedad.

5 HIPÓTESIS

La partícula adenoviral que expresa NPv30-3 formulada como polvo seco para inhalación es infectiva, estable y presenta propiedades tecnológicas y aerodinámicas adecuadas para la administración pulmonar.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general.

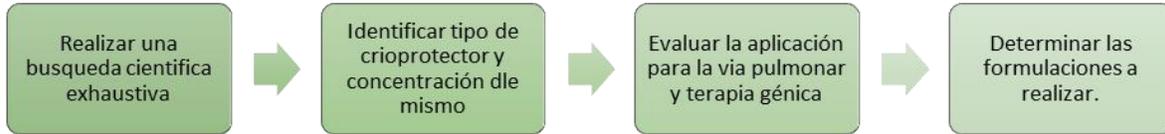
Desarrollar, caracterizar y evaluar *in vitro* una formulación como polvo seco para inhalación del sistema Ad5-NPV30-3 como un potencial tratamiento de terapia génica para cáncer pulmonar.

6.2 Objetivos específicos

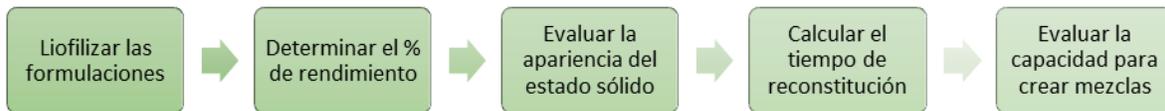
- Llevar a cabo estudios de preformulación a través de la selección de excipientes adecuados para el proceso de liofilización del sistema Ad5-NPV30-3, que permitan obtener el sistema en el estado sólido y con capacidad de infectividad.
- Caracterizar los polvos liofilizados obtenidos mediante pruebas físicas de apariencia, resuspensión y capacidad de generar mezclas para seleccionar aquellos que cuenten con las propiedades adecuadas para ser formulados como polvos secos para inhalación.
- Desarrollar estudios de formulación de los polvos seleccionados con excipientes para inhalación, caracterizando sus propiedades reológicas y aerodinámicas para definir las que presenten potencial deposición pulmonar y ser utilizadas para cargar el sistema Ad5-NPV30-3.
- Cargar el sistema Ad5-NPV30-3 en los polvos secos para inhalación optimizados y evaluar su eficacia *in vitro* a través de la determinación del título viral y la viabilidad celular en cultivo de células A549.

7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

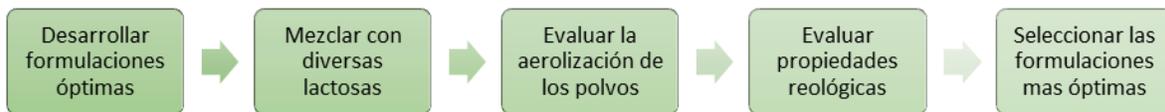
Preformulación parte I.- Obtención de las preparaciones para la liofilización.



Preformulación parte II.- Desarrollo y caracterización de las formulaciones de crioprotectores.



Formulación parte I: Desarrollo y caracterización de formulaciones óptimas de liofilizado y excipientes para inhalación



Formulación parte II.- Carga de partículas adenovirales en la formulación óptima



Formulación parte III.- Evaluación de la eficacia *in vitro*.



8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Estudios de preformulación.

8.1.1 Obtención de las preparaciones para la liofilización.

Se realizó una búsqueda exhaustiva en diversas fuentes de consulta sobre procesos de liofilización en vectores adenovirales, donde se ha estudiado la posibilidad de obtener una suspensión de vectores virales en el estado sólido con la ayuda de ciertos excipientes que protegen de la degradación.

A partir de la revisión bibliográfica, se prepararon 6 formulaciones, empleando 7 crioprotectores preseleccionados; albúmina sérica bovina, sacarosa, PEG 300, trehalosa, manitol, isoleucina y dextrosa, manteniendo constantes los valores de los 2 primeros en concentración de 0.3 y 2 % respectivamente. Seguido de dos niveles de concentración para el PEG 300, 25 y 40%, trehalosa al 2%, manitol al 4%, así como isoleucina y dextrosa al 1%. Sirviendo como medio de disolución una solución homogénea preparada a partir de TRIS 20mM, NaCl 25mM en agua tipo I.

8.1.2 Obtención de polvos liofilizados.

Con la finalidad de lograr desarrollar las formulaciones que favorecieran la estabilidad de las partículas virales el medio de suspensión de TRIS base 20mM y NaCl 25mM, se preparó bajo 2 condiciones: a) con glicerol al 5% y b) sin glicerol. Este agente se utiliza como ingrediente proveedor de estabilidad.

Se obtuvieron 10 mL de las formulaciones a las concentraciones que se muestran en las **Tablas 7 y 8**.

Tabla 7. Cantidades a adicionar de excipientes en formulaciones con un volumen de 10 mL.

Excipientes	[%]	Cantidad (mg)					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
Albúmina	0.3	30					
Sacarosa	2	200					
PEG 300	40 / 25	4000	-	-	2500	-	-
Trehalosa	2	-	200	-	-	-	-
Manitol	4	-	-	400	-	-	-
Isoleucina	1	-	-	-	-	100	-
Dextrosa	1	-	-	-	-	-	100

Tabla 8. Cantidades a adicionar de soluciones de excipientes en formulaciones con un volumen de 500 μL .

Soluciones	Volumen (μL)					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Albúmina 1%	150					
Sacarosa 10%	100					
PEG 300	200	-	-	125	-	-
Trehalosa 5%	-	200	-	-	-	-
Manitol 5%	-	-	100	-	-	-
Isoleucina 5%	-	-	-	-	100	-
Dextrosa 5%	-	-	-	-	-	100
Medio	50	50	150	125	150	150

Se prepararon 6 formulaciones (de F1 a F6), con volúmenes de 500 μL y de 10 mL. Cada una de las muestras se liofilizaron a una temperatura de -80°C , durante 24 horas bajo las siguientes condiciones: -80°C de temperatura y 200 mT de presión, empleando el equipo (Liofilizadora BenchTop Pro) que se observa en la **Figura 9**. Una vez finalizado el tiempo de liofilización, se recuperaron las muestras y se procedió a realizar la caracterización de los polvos (ver sección 8.2).



Figura 9. Formulaciones sometidas a proceso de liofilización (BenchTop Pro)

8.2 Caracterización física de los polvos liofilizados.

8.2.1 Apariencia y consistencia.

Una vez seleccionadas aquellas formulaciones con porcentajes de recuperación óptimos, se llevó a cabo una revisión de su apariencia y consistencia para seleccionar las que pudieran obtenerse en estado sólido, ya que es una parte de los objetivos en la formulación de polvos secos. Se hizo una visualización macroscópica, determinando bajo qué condiciones se obtuvieron polvos totalmente secos, libres de humedad, manipulables y con una consistencia desmoronable.

8.2.2 Capacidad para crear mezclas.

Para finalizar la caracterización y determinar si los polvos obtenidos por liofilización eran viables para ser formulados con otros polvos, es decir, que cumplieran la capacidad de crear mezclas fluidas con otros excipientes sólidos, se crearon mezclas binarias con lactosas grado inhalable, utilizando 4 tipos de lactosas: dos desarrolladas por molienda; ML001, ML006 (Respitose®) y dos desarrolladas por tamizado; LH200, LH201 (Lactohale®), en las siguientes proporciones; 1:1, 1:2 y 2:1 (lactosa: liofilizado).

Los materiales se adicionaron a una bolsa de plástico, mezclando por 5 minutos, determinando la apariencia macroscópica en relación al flujo considerando como: “alto” cuando la mezcla fluye sin interrupción y se presenta un polvo seco, “medio” si al momento de mezclar se presentan problemas como agregación, obtención de una masa ligeramente húmeda, y “bajo” al observar que las mezclas no se pueden crear, hay segregación o formación de masas aglomeradas y/o humectadas. A partir de los resultados de estos estudios de preformulación, se seleccionaron dos formulaciones, F3 y F5 como óptimas, las cuales se utilizaron para los estudios posteriores.

8.2.3 Rendimiento de liofilización.

El porcentaje de recuperación se consideró un factor importante al momento de caracterizar las formulaciones, esto debido a que, altos porcentajes de recuperación otorgarían una idea de la baja pérdida de masa y por ende una seguridad sobre el mantenimiento tanto de la concentración como del propio excipiente en cuestión. Para determinar este parámetro y estimar en términos de producción inicial y final, se obtuvo el peso de la masa liofilizada obtenida y se calculó la relación con respecto a la cantidad inicial de masa agregada. Una vez obtenidos dichos valores, se procedió a determinar el cociente entre estos con base en la siguiente ecuación 1.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Masa recuperada}}{\text{Masa inicial}} * 100$$

Ecuación 1.- Ecuación para obtener el porcentaje de recuperación de las formulaciones.

Esta determinación se realizó para cada una de las formulaciones por triplicado y calculando el valor promedio para cada una, lo que ayudaría a seleccionar cuál de las formulaciones propuestas presenta mayores rendimientos en términos tecnológicos y de manufactura. Este parámetro influye en la cantidad de insumos invertidos contra lo recuperado después de un proceso, así como la seguridad de que se mantuvieron las cantidades iniciales de materias primas o en su caso, una

estimación de la pérdida de masa, es por ello que fue sumamente importante realizar dicho ensayo para disminuir las pérdidas y lograr un mayor rendimiento.

8.2.4 Tiempo de reconstitución.

Como resultado de las formulaciones donde se cumplieron las características deseadas en el producto, a decir, liofilizados secos y manipulables, con porcentajes de rendimiento mayores al 80%, se evaluó el tiempo que tarda en reconstituirse cada muestra en una fracción de volumen representativa a las condiciones pulmonares. Eso se realizó tomando una cantidad de polvo liofilizado, aproximadamente de 1-5 mg, los cuales se colocaron en una caja Petri. Posterior a ello se adicionarían 2 mL del medio previamente descrito, midiendo con un cronómetro el tiempo que tarda en reconstituirse (o disolverse) la muestra. En los liofilizados en los que no se obtuvo un producto sólido, no se aplicó esta prueba.

8.3 Pruebas de Formulación como polvos secos para inhalación (DPI).

Los liofilizados óptimos se mezclaron con excipientes para inhalación en proporciones 1:1, 2:1 y 1:2 por triplicado, como se indica en la **Tabla 9**. Esto se llevó a cabo realizando las mezclas con una muestra final de 1 gramo por triplicado con los 4 tipos de lactosas grado inhalable; ML001, ML006 (Respitose ®) y LH200, LH201 (Lactohale ®) para cada una de las formulaciones, F3 y F5, el mezclado se llevó en una bolsa, simulando un mezclador de pantalón por 3 minutos para cada réplica.

Tabla 9. Desarrollo de las mezclas con respecto a las proporciones de lactosa-liofilizado de las formulaciones óptimas (F3 y F5).

Tipo de lactosa	Proporción (Lactosa: Liofilizado)	
	F3	F5
ML001	1:1	
ML006		
LH006		
LH201		
	2:1	
	1:2	

8.4 Caracterización de los DPI.

A las mezclas anteriores, ya como formulaciones DPI, se determinaron las propiedades reológicas y aerodinámicas como se indica a continuación.

8.4.1 Propiedades reológicas.

Para realizar la reología de polvos, se tomaron las mezclas previamente desarrolladas y se calcularon las siguientes propiedades:

8.4.1.1. Densidad aparente.

Se realizó mediante el método de probeta graduada. Se pesaron 1.5 g de la mezcla de polvos y se colocaron en una probeta de vidrio de 10 mL como se observa en la **Figura 10**. Los polvos se nivelaron cuidadosamente sin compactarlos y se procedió a tomar lectura del volumen aparente y con ello determinar la densidad aparente (δ_a), en gramos por mililitro (g/mL) empleando la ecuación mostrada en la **ecuación 2** (FEUM 2014).

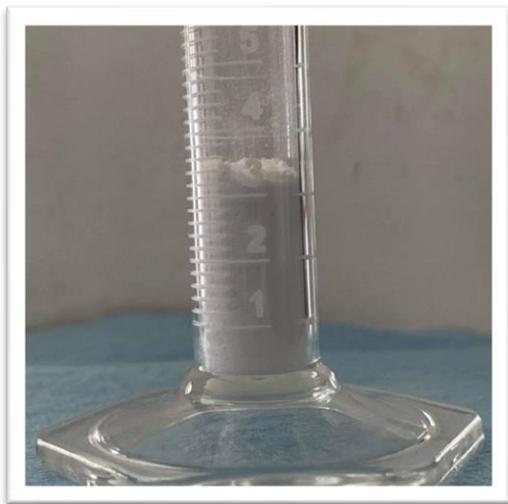


Figura 10. Determinación de la densidad aparente y compactada de las formulaciones óptimas.

$$\delta_a = \frac{m}{V_0}$$

Ecuación 2.- Ecuación para obtener la densidad aparente (δ_a).

8.4.1.2. Densidad compactada.

Se procedió a emplear la misma muestra utilizada en la determinación de la densidad aparente sin retirarla de la probeta tal como se observa en la **Figura 10**. La boca de la probeta se cubrió con una tapa de plástico para posteriormente elevarla a una altura de 10 ± 5 cm y proceder a impactarla sobre una superficie plana a ritmo constante, 250 veces (250 apisonamientos). Finalmente, se tomó lectura del volumen compactado y se calculó la densidad compactada en gramos por mililitros (g/mL) utilizando la ecuación 3 (FEUM, 2014).

$$\delta_c = \frac{m}{V_f}$$

Ecuación 3.- Ecuación para obtener la densidad compactada (δ_c).

8.4.1.3. Ángulo de reposo.

Se colocó un embudo de vidrio sobre un aro fijado a un soporte universal a una altura de 12.5 cm desde el borde inferior del embudo respecto a la superficie de prueba, se fijó de tal manera que quedara perpendicular a dicha superficie como se observa en la **Figura 11**. Se colocó 1 g de la mezcla de polvos en el embudo con el orificio inferior tapado, posteriormente se destapó el orificio y se dejó fluir el polvo hasta la superficie plana para medir la base del cono formado con un vernier correctamente calibrado. Esta determinación se realizó por triplicado, calculando el ángulo de reposo mediante la **ecuación 4** (FEUM 2014).



Figura 11. Evaluación del ángulo de reposo de las formulaciones óptimas.

$$AR = \tan^{-1} \left(\frac{2h}{D} \right)$$

Ecuación 4.- Ecuación para obtener el ángulo de reposo.

Donde:

AR= ángulo de reposo

h= altura

D= diámetro del lecho del polvo

8.4.1.4. Índice de Carr.

Para determinar el índice de Carr se utilizaron los datos obtenidos de los volúmenes de densidad aparente y compactada anteriormente determinados, siguiendo la ecuación 5 (FEUM 2014).

$$IC = 100(V_0 - V_f) V_0$$

Ecuación 5.- Ecuación para obtener el índice de Carr (IC).

Donde:

IC= índice de Carr

V_0 = volumen inicial

V_f = volumen final

8.4.1.5. Índice de Hausner.

Con base en las determinaciones de densidad aparente y densidad compactada se realizaron los cálculos para determinar el Índice de Hausner mediante la ecuación 6 (FEUM, 2014).

$$IH = \frac{V_0}{V_f}$$

Ecuación 6.- Ecuación para obtener el índice de Hausner.

Donde:

IH= índice de Hausner

V_0 = volumen inicial

V_f = volumen final

8.4.2 Aerolización; diámetro de masa media aerodinámica (MMAD).

La evaluación de la aerolización se llevó a cabo con un impactador de cascada de Andersen, conformado de 8 estaciones, una boquilla donde la formulación es introducida, un conducto y un suministro de vacío. El diseño se muestra en la

Figura 12 (USP)⁵⁵. Para este estudio se pesaron 1.5 g de las formulaciones, se colocaron en la boquilla del impactador y se empleó un vacío de aire de 28.3 l/min, durante 15 min. Una vez terminado el tiempo, se retiró la boquilla y la tapa para poder cuantificar la cantidad depositada por platillo. Se tomó el primer platillo y se pesó con su respectiva tapa. Los ocho platillos se pesaron de la misma manera y posteriormente se restó el peso inicial de cada depósito para determinar la masa depositada.

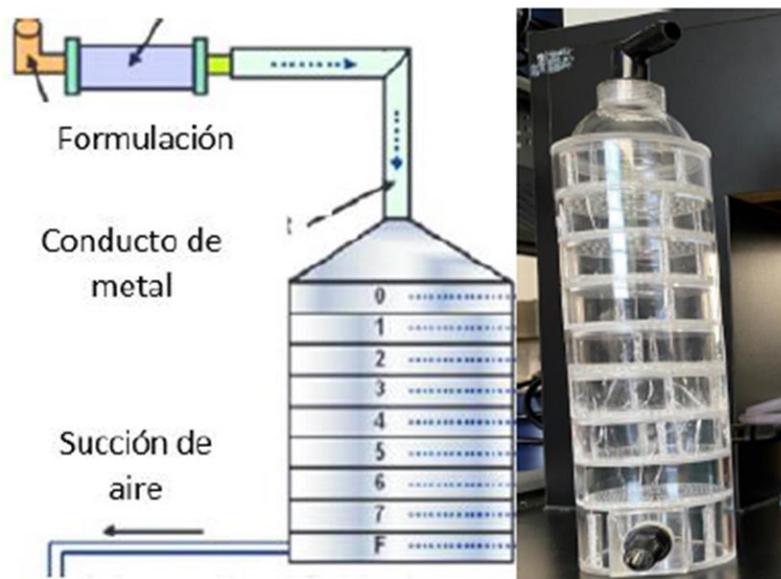


Figura 12. Impactador de cascada de Andersen. Adaptado de Aerosol Delivery of siRNA to the LungSystems Susanne R. Youngren-Ortiz et al.

Se preparó una cápsula en donde se añadió la formulación antes mencionada y posteriormente un DPI fue utilizado para introducir esta al equipo y proceder a la liberación del contenido mediante la ruptura de la cápsula. Después se colocó en la boquilla del impactador y con ayuda de vacío, la formulación se aspiró a través del mismo. Este método se llevó a cabo para determinar el diámetro de masa media aerodinámica (MMAD, según sus siglas en inglés) y la desviación estándar geométrica (GSD, por sus siglas en inglés) utilizando los pesos obtenidos en cada platillo. El cálculo se realizó por 2 métodos diferentes. El primero por medio del porcentaje en peso retenido en cada membrana y la segunda por el logaritmo del diámetro contra el porcentaje acumulado (como se sugiere en la USP)⁵⁵. De esta forma se seleccionaría cual es la formulación ideal para adicionar las partículas

adenovirales y tener la formulación final con un diámetro de masa media aerodinámica de $1 \mu m$ aproximadamente para lograr el objetivo del presente proyecto.

8.5 Carga de partículas adenovirales en la formulación óptima.

Con la finalidad de realizar la adición de la suspensión adenoviral a las formulaciones para liofilización y determinar la eficacia de las mismas bajo las medidas y condiciones de bioseguridad de manipulación del propio virus, se llevó a cabo lo siguiente con apoyo del cDr. Carlos Alberto Tavira Montalván dentro de las instalaciones BSL-2 de la Facultad de Farmacia en la UAEM. Se prepararon las formulaciones óptimas desarrolladas en el estado líquido, es decir la F3 y F5. Estas, junto con tubos eppendorf de 1.5 mL, micropipetas automáticas de plástico de 500 μL , puntas para micropipetas de 5, 10 y 500 μL , se sometieron a esterilización por calor húmedo durante 24 horas. Posterior a la preparación del material estéril, este y las suspensiones adenovirales Ad5/NPv30-3 preservadas a $-80^{\circ}C$ fueron llevados a un laboratorio de bioseguridad nivel II y bajo una campana de flujo laminar se procedió a realizar las mezclas de las formulaciones de crioprotectores en los tubos eppendorf. La suspensión adenoviral stock presentaba un título viral de $1.09 \times 10^9 pfu$, debido a la cantidad de suspensión y con la intención de que se tuvieran suficientes viales para los ensayos posteriores. Dicho título tuvo que ser diluido 100 veces, obteniendo 18 viales con un título viral de $1.09 \times 10^7 pfu/mL$, nueve viales de la formulación para la F3 y los otros nueve viales para la F5. Por lo que se tomaron 5 μL de la suspensión adenoviral stock adicionando 495 μL de medio, con un volumen final de 500 μL , de tal manera que al final se tendría el título viral de $1.09 \times 10^7 pfu/mL$.

Una vez preparadas, se destinó una muestra para realizar la prueba de esterilidad en caldo nutritivo con la intención de asegurar que el procedimiento anteriormente descrito se realizó bajo esas condiciones y evitar un falso positivo en los análisis siguientes. Posteriormente los viales fueron etiquetados, sellados y almacenados a $-80^{\circ}C$ durante 2 horas. Posterior al tiempo, estos fueron introducidos a la liofilizadora BenchTop Pro de SP Scientific ®. Se preparó el equipo a una temperatura de $-85^{\circ}C$,

se introdujeron los 18 viales al interior de la cámara del equipo, se selló y se encendió el vacío con la finalidad de obtener una presión de 200 mT. Una vez cumpliendo dichos parámetros se tomó el tiempo hasta cumplir 24 horas de proceso. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el vacío y se apagó el condensador, las muestras liofilizadas se extrajeron, se destinaron 8 viales para evaluación de eficacia *in vitro* y 10 viales se almacenaron.

8.6 Evaluación de la eficacia *in vitro* de los polvos liofilizados cargados con el sistema Ad5-NPV-30.

Este trabajo se realizó por parte del cDr. Carlos Tavira Montalván del laboratorio 7 dentro de la Facultad de Farmacia de la UAEM (FF-UAEM), debido a la necesidad de manejar sistemas virales infectivos bajo condiciones de bioseguridad controlada.

8.6.1 Título viral.

Se determinó la eficacia *in vitro* calculando el título viral de las formulaciones F3 (DPI3) y F5 (DPI5) ya cargadas con sistema viral, comparando con un stock de la misma suspensión haciendo uso de cultivo celular HEK 293. Para realizar dicho ensayo, las formulaciones liofilizadas (**Figura 13**) se resuspendieron en 500 μ L de buffer (Solución amortiguadora) 20mM TRIS, 25 mM NaCl, 2.5% glicerol, pH 8.0, debido a que es la solución amortiguadora en la cual las partículas adenovirales se encontraban estables aún sin formular. Posterior a ello, se evaluó el título viral de DPI3 y DPI5 por triplicado cada muestra con 4 repeticiones con diluciones de 10^{-3} a 10^{-12} . Las condiciones de cultivo se llevaron a cabo con medio DMEM/F12, deteniendo el proceso de infección con 10% de suero fetal bovino (SFB). Una vez realizado lo anterior, el título viral se evaluó mediante la técnica End Point Dilution (Ensayo de dilución del punto final) la cual se basa en infectar una población celular con diluciones seriadas del stock viral hasta obtener el número de partículas virales que infecte al 50% de la población,

por lo que se obtuvo un virus con la capacidad infecciosa por cada célula, determinando así la dosis infecciosa 50 (TCID₅₀, por sus siglas en inglés) y las unidades formadoras de placa (pfu, por sus siglas en inglés) que indican el número de partículas virales infecciosas (Lacey 2012; Flickinger 2013; Ozturk & Hu 2006).

Lo anterior se realizó en placas de 96 pozos (**Figura 14**) en el cultivo de células mencionado anteriormente (HEK293) en un volumen final de 100 µL, las cuales se observaron a los 9 días post infección. Una vez obtenidos los datos, estos se graficaron, colocando el stock y las formulaciones DPI3 y DPI5 en el eje de las abscisas y el título viral expresado como unidades formadoras de placa por mililitro (pfu/mL) en el eje de las ordenadas.



Figura 13. Vial de la formulación liofilizada con Ad/NPv30-3.

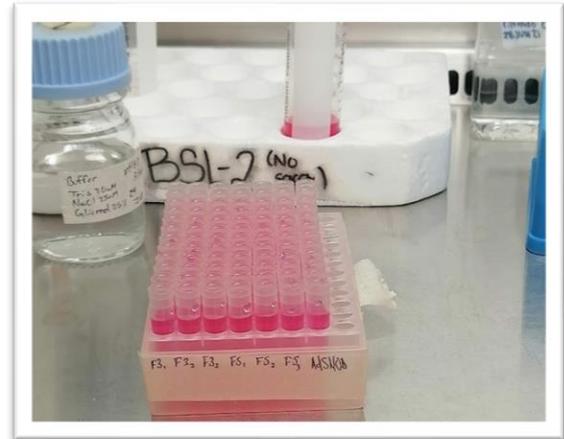


Figura 14. Ensayo de título viral por el método End Point Dilution.

8.6.2 Ensayo de infectividad.

Con la finalidad de evaluar si las formulaciones seleccionadas de Ad/NPv30-3, tanto DPI3 como DPI5 mantenían la propiedad de inducción de muerte celular *in vitro* en A549 (demostrado por Rodríguez, C en 2016), una vez liofilizadas, se llevó a cabo el ensayo de infectividad bajo las mismas condiciones que en el apartado 7.5.1., de medio DMEM/F12.

Para esta evaluación se determinó la transducción del vector adenoviral Ad5/NPv30-3 contenido en F3 y F5 en la línea celular A549 en placa de 6 pozos a una Multiplicidad de infección (MOI) (virus/célula) de 30 para cada formulación por triplicado denominadas como sigue: F3a, F3b, F3c, F5a, F5b y F5c. Como se sabe, la transducción es el proceso por el cual genes exógenos son transferidos a una célula por acción de un virus no infectivo (Kim & Eberwine 2010). Se utilizaron como controles positivos células HEK293 infectadas con Ad5-NPv30-3 MOI 30 y células A549 transducidas con Ad5-NPv30-3 MOI 30 y como controles negativos, es decir, sin infectar, cultivo de células HEK 293 y células A549. Los cultivos transducidos se fijaron y tiñeron con cristal violeta, se procedió a calcular el porcentaje de viabilidad celular y se visualizaron al microscopio bajo un objetivo 10x. Con base en lo anterior, se realizó el análisis de los datos comparando la magnitud de la viabilidad de las formulaciones F3 y F5 con respecto a los controles positivos. La significancia estadística en la determinación de la viabilidad celular se determinó por la prueba ANOVA y la prueba HSD de Tukey. Las células se dejaron fijadas en buffer de cocodilatos para realizar micrografías de transmisión para las formulaciones F3 y F5.

Posterior a ello, se determinó la viabilidad celular en cultivos de células A549 transducidos con el vector Ad5-NPv30-3 por el método colorimétrico MTS. Dicho ensayo usando el reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution, se basa en la conversión celular de la sal tetrazaolium en un formazán, el cual es un producto de fácil detección utilizando un lector de placas de 96 pocillos. Con la ayuda de

dicho reactivo, permite medir (a una longitud de onda de 490nm) la cantidad de formazán producido como indicador del número de células viables en cultivo. Debido a que el producto de formazán MTS es soluble en cultivo celular y tiene una coloración que puede medirse por espectrofotometría UV a la longitud de onda mencionada anteriormente. La cantidad de células metabólicamente viables será proporcional a la coloración que presente el medio de cultivo, haciendo posible que este ensayo se utilice para la determinación de viabilidad celular (Promega, 2021).

Se adicionaron a cada pozo 100 μ L de las formulaciones F3 y F5, a tres concentraciones; 2×10^4 PFU/mL, 5×10^3 PFU/mL y 5×10^2 PFU/mL, así como un control positivo con células A549 transducidas con el Ad5-NPv30-3 a una MOI-30 como ya se ha mencionado anteriormente y un control negativo sin tratamiento con 8 repeticiones, se adicionaron 20 μ L del reactivo y se incubó la placa a 37°C por 1-4 horas a 5% de CO₂. Una vez concluido, se leyó a 490 nm utilizando un espectrofotómetro. Se graficaron los resultados promedio \pm su respectiva desviación estándar.

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Preformulación parte I.- Obtención de las formulaciones para la liofilización.

A partir de la búsqueda bibliográfica, se seleccionaron 7 excipientes crioprotectores a una concentración específica: albúmina al 0.3%, sacarosa y trehalosa al 2% ya que según los estudios reportados por Zhang y colaboradores en el 2009, estos excipientes mostraron mejorar la estabilidad de adenovirus recombinantes reduciendo la pérdida del título viral hasta en una orden de magnitud lo que permitiría mantener las propiedades del vector incluso después de la manipulación en el proceso de liofilización. Además se seleccionó PEG 300 al 25 y 40% dado que en el 2020 Chen, Y, Liao, Q y colaboradores demostraron que al utilizar este excipiente como crioprotector, además de dextrosa e isoleucina a concentraciones bajas, le otorga a ciertos vectores como adenovirus y poxvirus formulados una cierta estabilidad al mantener el título viral con respecto al tiempo, incluso en periodos de almacenamiento de hasta 25 días tanto a 4 o 25 °C, esto comparándolo con una formulación en suero fetal bovino observando la pérdida del título viral de éste desde los primeros 7 días, por lo que se demuestra la efectividad en el uso de dichos crioprotectores al momento de liofilizar. Así mismo, se seleccionó manitol al 4% debido a que según un estudio en el 2012 por Chen, S y colaboradores, este excipiente utilizado en concentraciones entre un 4 y 5 % le otorgó a formulaciones adenovirales una reducción en la pérdida estadísticamente significativa del título viral comparado con un grupo control que solo contenía Tris 10 mM, NaCl 100mM y MgCl₂ 1mM como aditivos que estabilizan al propio virus en suspensión, incluso en el presente trabajo, Tris base 20mM y NaCl 25mM fueron utilizados como medio de disolución debido a la propia estabilidad intrínseca (Chen, S., et al 2012). Con base en lo descrito anteriormente, se propusieron 6 formulaciones denominadas como F1 a la F6, donde las concentraciones de albúmina y sacarosa se mantuvieron constantes para las 6 formulaciones, el resto de los excipientes se fueron aleatorizando (**Tabla 10**) con base en formulaciones ya

probadas para algunos vectores virales según los estudios previamente descritos.

Tabla 10. Formulaciones propuestas de crioprotectores para Ad5/NPv30-3, enumeradas de F1-F6.

Crioprotectores	Porcentajes [p/v]					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Albúmina	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Sacarosa	2	2	2	2	2	2
PEG 300	40	-	-	25	-	-
Trehalosa	-	2	-	-	-	-
Manitol	-	-	4	-	-	-
Isoleucina	-	-	-	-	1	-
Dextrosa	-	-	-	-	-	1
Medio: TRIS 20mM + NaCl 25 mM						

9.2 Preformulación parte II.- Desarrollo y caracterización de las formulaciones de crioprotectores.

Una vez preparados los medios de disolución con y sin glicerol, condición “a” y “b” respectivamente, así como las soluciones porcentuales de crioprotectores, se desarrollaron las formulaciones a un volumen de 500 μ L y 10 mL, estas fueron sometidas a liofilización bajo las condiciones mencionadas en el apartado 7.2. Las muestras obtenidas se muestran en las **Figuras 15 y 16**, según el volumen de producción respectivamente. Es importante mencionar que la condición “a” y “b” fue un parámetro importante a evaluar ya que como se describió anteriormente, esta condición es con base en la presencia o ausencia de glicerol 5% respectivamente, por lo que las formulaciones obtenidas presentaron las mismas características macroscópicas.

Como se puede observar, las formulaciones F1, F4 y F6 no alcanzaron un estado sólido durante el proceso de liofilización. Por su parte, las F2, F3 y F5 sí lograron obtener el estado sólido. De las muestras no secas, F1 y F4 en particular,

contenían PEG 300 al 40 y 25% respectivamente, un excipiente para el que no se obtiene un estado sólido a las condiciones ambientales, lo que podría explicar en la rehidratación de las muestras. La dextrosa, monosacárido más conocido como glucosa, fue probado en la F6 debido a que, en un estudio del 2020, se utilizó dextrano como crioprotector, siendo este último un polisacárido complejo de glucosa, que por tener características particulares funcionaría, sin embargo, esta formulación no logró obtener el estado sólido. Las F2, F3 y F5 fueron recuperadas en su estado sólido, gracias a los excipientes ya mencionados donde en diversos estudios han demostrado dicho estado por sus características de criopreservación, por lo que fueron seleccionadas como óptimas en términos de llevar a cabo las siguientes etapas de caracterización (Chen et al 2020).

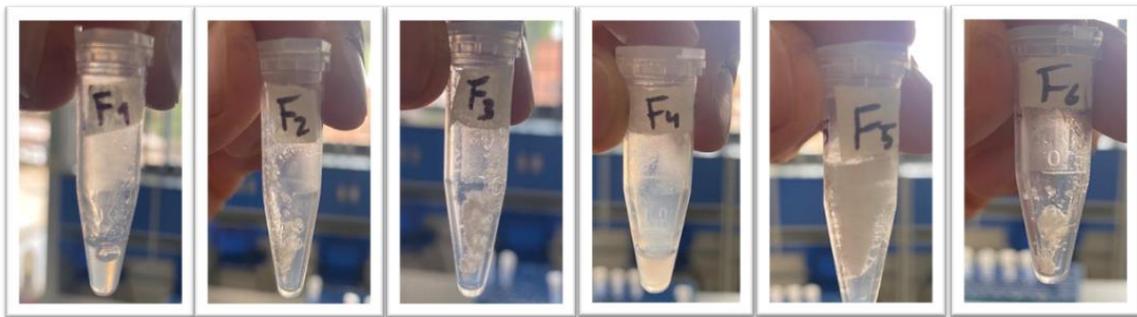


Figura 15. Formulaciones en 500 μL (F1-F6) obtenidas posterior al proceso de liofilización.



Figura 16. Formulaciones en 10 mL (F1-F6) obtenidas posterior al proceso de liofilización.

Las características físicas observadas en las muestras liofilizadas fueron observadas tanto en los viales de 500 μL , como en las muestras de 10 mL, de tal manera que el escalamiento es posible y adecuado; las formulaciones con carga de virus se realizaron a volúmenes de 500 μL , pero se deja establecido que el escalamiento a mayores volúmenes puede ser factible.

9.2.1 Apariencia y consistencia.

Para las muestras liofilizadas se caracterizó su apariencia y consistencia, contemplando las condiciones “a” y “b”; presencia y ausencia de glicerol 5%, respectivamente. Los resultados se muestran en la **Tabla 11**, donde se destacan las formulaciones F2, F3 y F5 con la condición “b”, que con el análisis del punto anterior fueron seleccionadas para continuar con los estudios de preformulación.

Tabla 11. Evaluación de apariencia y consistencia de las preparaciones liofilizadas; a: con glicerol al 5%, b: sin glicerol.

Condición	Formulación	Consistencia/ apariencia
a	F1	Mezcla heterogénea
	F2	Mezcla heterogénea
	F3	Polvo humectado
	F4	Solución heterogénea
	F5	Polvo humectado
	F6	Gelificación
b	F1	Mezcla heterogénea
	F2	Polvo seco homogéneo
	F3	Polvo seco homogéneo
	F4	Mezcla heterogénea
	F5	Polvo seco homogéneo
	F6	Polvo seco heterogéneo

Se observó que las formulaciones liofilizadas bajo la condición “a” presentaron una consistencia y apariencia húmeda (povos humectados), pegajosa (gelificación), no propia de un estado sólido como polvo seco y algunas caracterizadas como soluciones heterogéneas para el caso de F1, F2 y F4, las cuales no lograron dicho estado debido a la presencia del glicerol que, por sus propiedades humectantes, rehidrata el polvo una vez obtenido el sólido durante el proceso.

Para la condición “b”, es decir sin presencia de glicerol, sí se logró obtener el estado sólido como un polvo seco para el caso de las formulaciones F2, F3, F5 y F6; sin embargo, para la F6 se encontró una cantidad casi nula, como polvo seco de apariencia de algodoncillo o “telaraña” caracterizado como polvo heterogéneo sin ninguna propiedad de flujo o manipulación, por lo que fue descartada. Para las formulaciones F2, F3 y F5 se consideraron otras propiedades cómo la obtención de un polvo homogéneo y aparentemente con buen flujo, así como el buen rendimiento del proceso que prosigue.

9.2.2 Capacidad para crear mezclas.

Con la finalidad de evaluar las propiedades reológicas de los povos secos para inhalación se determinó la habilidad de los povos liofilizados para mezclarse con otros povos, principalmente con algunos excipientes para inhalación debido a que se pretende mezclar con estos para lograr la formulación final. En la **Tabla 12** se resumen los resultados de dicha evaluación para las preparaciones donde se obtuvo un sólido liofilizado; bajo condiciones “a” y “b”.

Tabla 12. Capacidad de las preparaciones liofilizadas para crear mezclas con polvos farmacéuticos

Condición	Formulación	Capacidad p/ crear mezclas
a	F3	Baja
	F5	Baja
b	F2	Alta
	F3	Alta
	F5	Alta
	F6	Media

Las formulaciones que se obtuvieron en la condición “a” presentaron una capacidad baja para crear mezclas sólidas debido a que, por la presencia del glicerol. Éstas no fluyen libremente como un polvo seco por la presencia de humedad. Sin embargo, aquellas bajo condición “b” de liofilización presentaron altas capacidades de crear mezclas para la F2, F3 y F5 con otros polvos sin interrupción de flujo ni presencia de humedad. Lo anterior representa gran importancia para polvos farmacéuticos para inhalación debido a que se busca una mezcla homogénea que fluya, que no forme aglomeraciones y a su vez que no presente ningún tipo de presencia de humedad dada la complejidad anatomofisiológica de los pulmones.

9.2.3 Rendimiento del proceso de liofilización.

En esta etapa, las muestras fueron recuperadas del recipiente con ayuda de una espátula, para unos casos con un vaciado y en otros con raspado en las paredes del mismo, determinando el peso de sólidos para las preparaciones F2, F3 y F5. En la **Tabla 13** se muestran las 3 formulaciones con los excipientes correspondientes, así como la masa total teórica inicial, la masa recuperada y el rendimiento expresado como porcentaje de recuperación.

Tabla 13. Cálculo de los porcentajes de recuperación para las formulaciones recuperadas.

Crioprotectores	Cantidad (g)		
	F2	F3	F5
Albúmina	0.03		
Sacarosa	0.2		
Trehalosa	0.2	-	-
Manitol	-	0.4	-
Leucina	-	-	0.1
TRIS + NaCl	0.0242 + 0.0146		
Sólido teórico (g)	0.4688	0.6688	0.3688
Sólido recuperado (g)	0.3224	0.5987	0.3351
Rendimiento (%)	68.8	89.5	90.9

Observando porcentajes de recuperación para F2, F3 y F5 de 68.8, 89.5 y 90.9% respectivamente, los cuales se consideran rendimientos relativamente ideales debido a que la pérdida de muestra durante del proceso de liofilización para dichos casos es menor al 30%. Cabe mencionar que estos valores se ven influenciados por la técnica de manipulación al momento de recuperar la muestra; los cuales pueden ser cercanos al 100% siempre y cuando el proceso se optimice en conjunto con el envase que se utilizaría para la liofilización y así, poder evaluar con más precisión la masa perdida, conocida como merma. La F2 además de presentar el rendimiento menor, el polvo observado presentaba una consistencia espesa, adhesión a las paredes del recipiente, no presentaba físicamente un flujo, por lo que, con base en lo anterior, se eligieron como formulaciones óptimas la F3 y F5, que adicionalmente presentan valores de rendimiento mayores al 85 %.

9.2.4 Tiempo de reconstitución.

Hasta el momento se tuvieron como formulaciones con propiedades físicas y de rendimiento óptimas la F3 y F5, que se distinguen por la presencia de manitol 4% e isoleucina 1%, como crioprotectores respectivamente, con buenas propiedades para mezclarse con otros polvos, así como altos porcentajes de recuperación.

Los tiempos de reconstitución se evaluaron para las formulaciones obtenidas en el estado sólido, como se muestra en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Tiempo de reconstitución de las formulaciones obtenidas en estado sólido.

Condición	Formulación	Tiempo de reconstitución (segundos)
b	F2	< 10
	F3	< 10
	F5	< 10

En todos los casos se presentaron tiempos de reconstitución menores a los 10 segundos, una vez que se adicionaron 2 mL de medio TRIS/NaCl. Específicamente, la observación del proceso de reconstitución se muestra en las **Figuras 17 y 18** para las formulaciones F3 y F5. Se considera que los tiempos de reconstitución son adecuados en términos de no comprometer a la partícula viral al estrés fisicoquímico, y a la velocidad con que esta es puesta sobre el órgano objetivo y generar la respuesta terapéutica. De igual manera es importante considerar la formulación final, así como la vía de administración debido a que estos sistemas son considerados altamente higroscópicos, algunos autores al momento de realizar estudios con adenovirus y formulaciones en criopreservación han demostrado que no es fácil elegir la

formulación final y por ende la vía de administración que hasta hace unos años se consideraban vías invasivas para que posteriormente con ayuda de la liofilización, logrando una estabilidad fisicoquímica y biológica poder pre-seleccionar vías alternas y no invasivas para administrar dichas formulaciones con ventajas superiores a las previas.

Así, con las formulaciones F3 y F5 en condición de liofilización “b”, se tienen dos propuestas potenciales para ser acarreadas en excipientes para inhalación que garanticen la entrega de las partículas en niveles profundos de los pulmones.

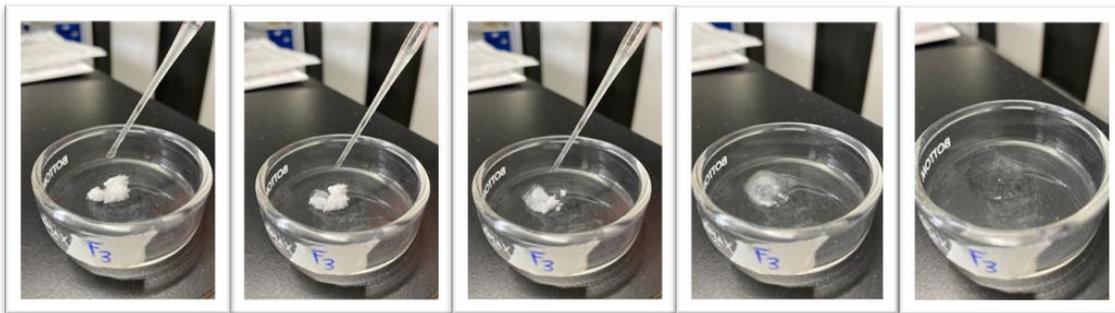


Figura 17. Proceso de reconstitución de la formulación 3.

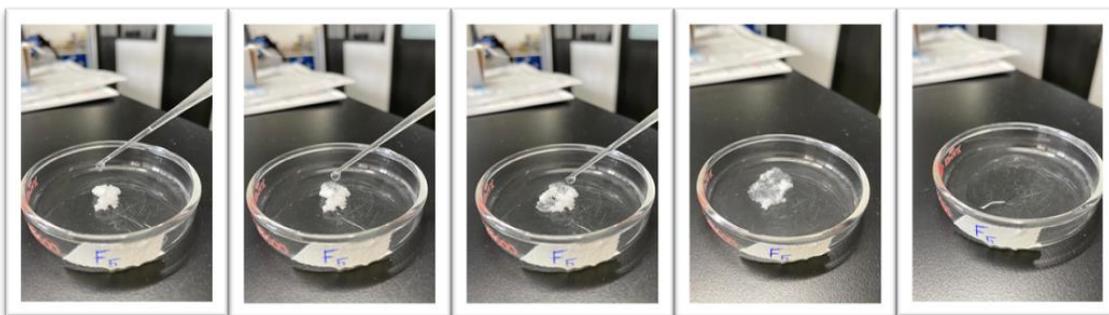


Figura 18. Proceso de reconstitución de la formulación 5.

9.3 Estudios de Formulación.

9.3.1 Obtención de los DPIs.

Con base en la caracterización previa se seleccionaron las preparaciones liofilizadas F3 y F5. Estas formulaciones fueron desarrolladas bajo los procedimientos antes mencionados obteniendo cantidades suficientes para la obtención de polvos secos para inhalación (DPIs) y la caracterización de las propiedades reológicas, obteniendo al menos 5 gramos de cada una. Se obtuvieron mezclas físicas en proporciones 1:1, 1:2 y 2:1 (lactosa: liofilizado), las muestras liofilizadas por triplicado se observan en las **Figuras 19 y 20**, donde estas presentaron excelentes propiedades físicas, buen comportamiento en cuánto a manipulación, tal como se han descrito con anterioridad estas dos formulaciones.



Figura 19. Polvo liofilizado optimizado de la formulación 3.



Figura 20. Polvo liofilizado optimizado de la formulación 5.

9.4 Caracterización de los DPIs.

9.4.1 Propiedades reológicas

En cuanto a la reología de las formulaciones DPI3 y DPI5 se observó lo siguiente. Para los estudios de formulación se utilizaron dos lactosas grado inhalable (Respitose® y Lactohale®); dos de ellas elaboradas por molienda (ML001 y ML006) y dos elaboradas por tamizado (LH200 y LH201). Una vez obtenidas las mezclas de estos excipientes con los liofilizados L3 y L5 a las proporciones antes indicadas, se determinaron las propiedades de flujo y compresibilidad de los polvos, ya como DPIs. Los resultados se muestran a continuación, representando en la **Tabla 15** los estudios realizados con lactosas a una proporción 1:1.

Tabla 15. Determinación de la reología de las mezclas en proporción 1:1 (lactosa: liofilizado).

<i>Tipo de lactosa Mezcla (1:1)</i>	<i>ρ aparente (g/mL)</i>	<i>ρ compactada (g/mL)</i>	<i>Índice de Carr (%)</i>	<i>Índice de Hausner</i>	<i>Ángulo de reposo(°)</i>	<i>Propiedad de flujo</i>	<i>Compresibilidad</i>
ML001	0.28	0.32	12.04	1.14	14.87	Bueno	Mala
ML006	0.25	0.31	16.95	1.20	16.71	Bueno	Mala
LH 200	0.20	0.24	16.67	1.20	13.38	Bueno	Mala
LH201	0.29	0.32	11.43	1.13	18.08	Excelente	Mala

En el presente ensayo se observó que, para la densidad aparente y compactada, en las 3 proporciones utilizadas (1:1, 2:1 y 1:2), se obtuvieron valores menores a 0.5 g/mL, lo que de acuerdo con la literatura científica presentan buenas propiedades para aerización. Este es un criterio que debe presentar un DPI, ya que se tiene menos resistencia con respecto a la fuerza de gravedad, además de un material poroso donde el aire puede introducirse para general el aerosol. En las mismas tablas se resumen los valores obtenidos de índice de Carr (IC) e índice de Hausner (IH), la relación entre estos parámetros según la literatura, determinan las propiedades de flujo de polvos y su comportamiento reológico, los datos se muestran en la **Tabla 16** y **17** para las proporciones 2:1 y 1:2 respectivamente.

De acuerdo con la FEUM, valores entre 5 y 12% para el IC es característico de un tipo de flujo excelente y una mala compresibilidad, como sucede en el uso de LH201 con las 3 proporciones y la ML001 para las proporciones 2:1.

Tabla 16. Determinación de la reología de las mezclas en proporción 2:1 (lactosa: liofilizado).

Tipo de lactosa Mezcla (2:1)	\int aparente (g/mL)	\int compactada (g/mL)	Índice de Carr (%)	Índice de Hausner	Ángulo de reposo(°)	Propiedad de flujo	Compresibilidad
ML001	0.32	0.34	8.42	1.09	16.67	Excelente	Mala
ML006	0.29	0.36	17.65	1.21	15.63	Aceptable	Mala
LH 200	0.27	0.31	13.27	1.15	22.16	Bueno	Mala
LH201	0.33	0.35	6.52	1.07	20.97	Excelente	Mala

Por otro lado, las otras mezclas presentaron un tipo de flujo bueno encontrándose valores entre 12 y 17% de IC; ML001 y ML006 en proporción 1:1 y para LH200 en proporciones 1:1 y 2:1. Bajo la misma fuente de consulta, se observaron propiedades de flujo aceptables las mezclas con ML006 en proporción 2:1 y LH200 en 1:2, con un IC entre un 18 al 22%. Siendo que para las mezclas con lactosas ML001 y ML006 en proporción 2:1 se obtuvieron pobres propiedades de flujo debido a que los valores de IC obtenidos se encuentran entre el 26 y el 31%. Una discusión en este mismo sentido y con los mismos resultados se presenta para el índice de Hausner (IH) y el ángulo de reposo.

Tabla 17. Determinación de la reología de las mezclas en proporción 1:2 (lactosa: liofilización).

Tipo de lactosa Mezcla (1:2)	\int aparente (g/mL)	\int compactada (g/mL)	Índice de Carr (%)	Índice de Hausner	Ángulo de reposo(°)	Propiedad de flujo	Compresibilidad
ML001	0.25	0.34	27.50	1.38	17.41	Pobre	Mala
ML006	0.29	0.39	25.96	1.35	16.05	Pobre	Mala
LH 200	0.25	0.32	22.50	1.29	16.90	Aceptable	Mala
LH201	0.34	0.37	7.95	1.09	19.60	Excelente	Mala

Con base en los resultados se puede observar una proporcionalidad directa entre la cantidad de lactosa con respecto al incremento en las propiedades de flujo; algo esperado para los polvos liofilizados que en esencia presentaron problema de fluidez desde su obtención. Sin embargo, al contrastar estas propiedades para todas las mezclas o DPIs, la literatura marca que este tipo de formulaciones presentan malas propiedades de flujo y bajos niveles de compresibilidad, debido a que no son poco densos (<0.5 g/mL), baja relación masa/volumen, alta porosidad y por ende fácilmente aerolizables.

Así, con base en la descripción reológica se seleccionó la lactosa LH201 (Lactohale®) como el excipiente ideal para el desarrollo de DPIs para las muestras liofilizadas F3 y F5, mismas que fueron retadas al proceso de aerolización en impactador de cascada.

9.4.2 Aerolización y diámetro de masa media aerodinámica.

En la elaboración de un DPI se requiere de la incorporación de excipientes aprobados y adecuados con partículas con un diámetro mayor que el vector adenoviral liofilizado para mejorar la dispersión. En la actualidad el más utilizado es la lactosa monohidratada (Da Silva *et al*, 2017). Con la intención de lograr la administración de la formulación y posterior deposición de las partículas en el epitelio alveolar del pulmón de manera efectiva y dirigida, es necesario desarrollar una formulación pulmonar con un diámetro de masa media aerodinámica (MMAD) menor a $1 \mu\text{m}$, mientras que para regiones de broncos y bronquiolos se requiere un MMAD entre 1 y $5 \mu\text{m}$. El desarrollo de formulaciones de polvo seco para inhalación de vectores virales es una propuesta atractiva porque evita en primera instancia la vía invasiva en la administración de estos, además de lograr una terapia dirigida mejorando la eficacia del mismo e incluso la baja susceptibilidad al crecimiento microbiano (Healy *et al* 2013).

Ya definido el excipiente para inhalación (Lactohale®), a las formulaciones DPI3 y DPI5 se les evaluó la deposición pulmonar de partículas *in vitro*, empleando el

método de cascada de Andersen, y con ello la determinación del MMAD; el cual también se puede estimar con la ecuación 7, donde d es el diámetro de la partícula previamente calculado, “p” es la densidad compactada, “po” es la densidad aparente y “X” es el factor de superficie, que para sistemas esféricos el valor es igual a 1. El objetivo es obtener un MMAD de entre 0.1-1µm.

$$MMAD = d \left(\frac{p}{poX} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Ecuación 7.- Ecuación para obtener el diámetro masa media aerodinámica (MMAD).

Donde
d: diámetro de la partícula
p: densidad compactada
po: densidad aparente
X: factor de superficie

En la **Tabla 5** se muestran los valores de la d_{0.5} de las diversas lactosas comerciales, donde para el caso de las utilizadas en la reología de polvos, la LH 201 es aquella que presenta el diámetro de partícula más pequeño (25 µm), incluso fue la que, en cualquier proporción evaluada, presentó excelentes propiedades de flujo y con densidades cercanas a 0.3 g/mL. Se llevó a cabo la aerolización por triplicado las DPI3 y DPI5. En la **Tabla 18** se presentan los valores obtenidos de MMAD y la desviación estándar, siendo ideales en todos los casos para el desarrollo de una formulación que va dirigida hacia el epitelio alveolar, sitio donde se desea que el vector Ad5/NPv30-3 se internalice y realice el efecto citotóxico.

Tabla 18. Diámetro de masa media aerodinámico (MMAD) para las formulaciones DPI3 y DPI5 con Lactohale® 201 (LH201).

DPI 3 y DPI 5 con LH201	MMAD promedio (µm)	DE (µm)
1 a 2	1.05	0.09
2 a 1	1.34	0.04
1 a 1	1.55	0.23

9.5 Carga del sistema Ad5-NPV-30 en los polvos liofilizados.

Una vez realizada la carga de las partículas adenovirales en los polvos liofilizados L3 y L5 se realizó la prueba de esterilidad, observándose que posterior a las 24 horas de incubación no hubo crecimiento bacteriano por lo que se aseguró la esterilidad de éstas para poder proceder a realizar el proceso de liofilización (ver Figuras 21 y 22).



Figura 21. Prueba de esterilidad de L3 y L5 en caldo nutritivo.



Figura 22. Prueba de esterilidad de L3 y L5+ Ad5/NPv30-3 en caldo nutritivo.

Los viales fueron sometidos a liofilización bajo las condiciones mencionadas en el apartado 8.4. La incorporación de la cantidad de vector adenoviral no se consideró significativa en masa ($5\mu L$), respecto al total de excipientes, por lo que las propiedades reológicas y aerolizables de los DPIs no se verían modificada. Los resultados del proceso de liofilización fueron exitosos obteniendo un polvo seco bajo las condiciones llevadas a cabo, pero ya con la carga viral. Estos polvos se destinaron a los estudios de título viral y eficacia *in vitro*.

9.6 Evaluación de la eficacia *in vitro*.

La determinación de la eficacia *in vitro* de las formulaciones DPI3 y DPI5 cargadas con las partículas adenovirales (Ad5/NPv30-3) se realizó mediante la determinación de la infectividad en cultivo celular, con el objetivo de garantizar que todo el proceso de formulación fuese exitoso y, que las partículas virales continuaran activas. Los resultados obtenidos confirman que es posible obtener vectores virales en el estado sólido bajo un proceso conocido como liofilización empleando excipientes crioprotectores que le otorgan estabilidad a los mismos, manteniendo títulos virales con pérdidas estadísticamente no significativas y que permiten la manipulación de éste, en concordancia con lo reportado por Zhang, Y., Chen, S., Liao, Q.

9.6.1 Título viral

En la **Tabla 19** se presentan los promedios de los valores para el título viral de las formulaciones liofilizadas, teniéndose que, para la DPI3, el título viral fue de $1.26 \times 10^5 \text{ pfu/mL} \pm 1.69 \times 10^4$, y para la DPI5 de $5.72 \times 10^5 \text{ pfu/mL} \pm 1.67 \times 10^4$. Además, se evaluó un control (stock) que presentó un título viral de $1.53 \times 10^7 \text{ pfu/mL} \pm 6.19 \times 10^6$, el cual era el título del stock antes de liofilizar. Sabiendo que se partió de un título viral teórico de $1.09 \times 10^7 \text{ pfu/mL}$ para cada formulación, entonces la pérdida de estas fue de dos órdenes de magnitud, tal como se observa en la **Figura 23**. Cabe mencionar que, en estudios ya realizados por otros autores, no se han observado cambios mayores a dos órdenes de magnitud, por lo que no implica un cambio significativo y los resultados obtenidos corresponden a lo reportado. Sin embargo, partiendo de los resultados observados en las formulaciones con respecto a proteger el sistema Ad5/NpV30-3, podría desarrollarse una formulación combinando los excipientes crioprotectores de ambas formulaciones con la finalidad de mejorar la eficacia y mejorar su estabilidad.

Tabla 19. Evaluación de los títulos virales promedio del stock Ad5/NPv30-3, DPI3 y DPI5 en cultivo celular HEK 293 ± desviación estándar.

Condición	Titulo viral	DE ±
	(pfu/mL)	
stock	1.53×10^7	6.19×10^6
DPI3	1.26×10^5	1.69×10^4
DPI5	5.72×10^5	1.67×10^5

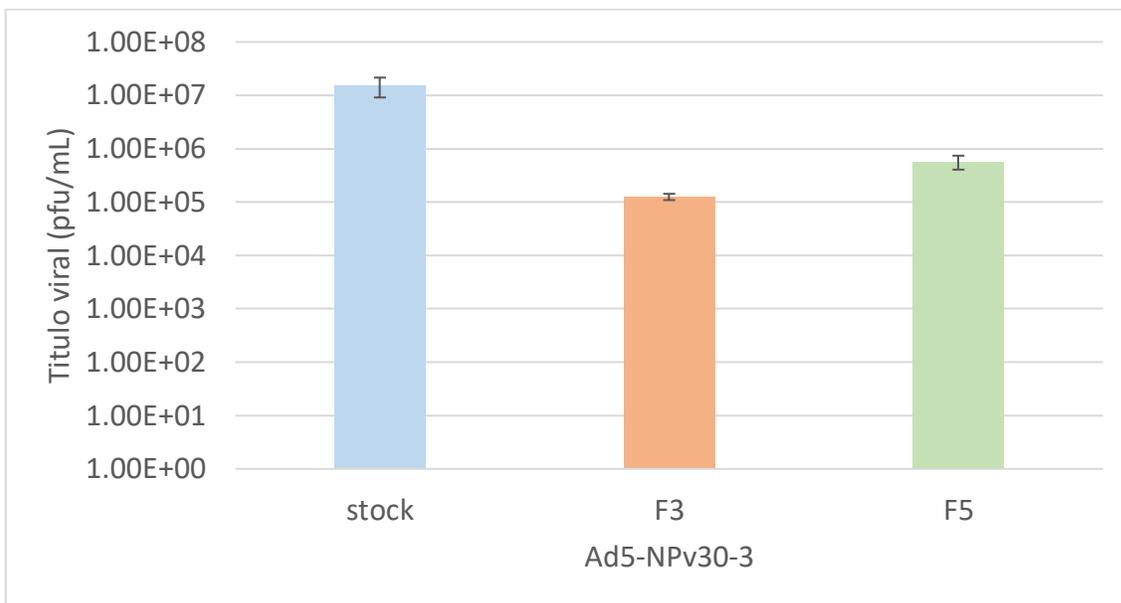


Figura 23. Título viral promedio de la suspensión stock sin liofilizar, F3/ Ad5/NPv30-3. y F5/ Ad5/NPv30-3 liofilizadas.

9.6.2 Ensayo de infectividad (eficacia *in vitro*).

Asimismo, para las formulaciones DPI3 Y DPI5 se determinó la infectividad al transducir en cultivo celular A549 (modelo *in vitro* de cáncer pulmonar). Como se observa en la **Figura 24**, las placas teñidas con cristal violeta muestran la formación de placas líticas en las tres réplicas de las formulaciones DPI3 y DPI5, en comparación al control negativo mostrado en la **Figura 25**; sin embargo, en comparación con el control positivo de transducción (Ad5/NpV30-3) mostrado en la misma figura, se observa que el efecto de las formulaciones en la formación de las placas líticas es menor. Los resultados evidenciaron una reducción de la viabilidad del 32 y 27 % para DPI3 y DPI5 respectivamente, ver **Tabla 20**. Este análisis se realizó usando los controles positivos y negativos, como se ha mencionado anteriormente usando cultivo de células HEK293 (con un 98% de viabilidad) y el cultivo de células A549 (con un 95% de viabilidad). Siendo que al infectar el cultivo celular HEK293 como control positivo de producción de partículas virales con el vector Ad5/NPv30-3 (sin formular), se presenta una reducción de la viabilidad celular de hasta el 67%, lo que es esperado debido a que éste es el sistema en el que se producen los vectores adenovirales y por tanto se presenta un efecto lítico en las placas. En el cultivo de células A549 con Ad5/NPv30-3 sin formular, se da una reducción de la viabilidad celular del 38% (control positivo de transducción A549/Ad5NpV30). Observando que esta reducción de la viabilidad celular es similar a DPI3 y DPI5 con un 6 y 11 % de diferencia respectivamente contra el control. Dicha diferencia es debido a que el título viral bajó y no es comparable a los usados en trabajos anteriores. A pesar de la reducción del título viral en el ensayo previo para las formulaciones, no se observó una pérdida en infectividad estadísticamente significativa, por lo que se puede sugerir que ambas formulaciones son adecuadas para integrarse como DPIs.

Células A549 transducidas con 100 μ l de la formulación a las 96 h

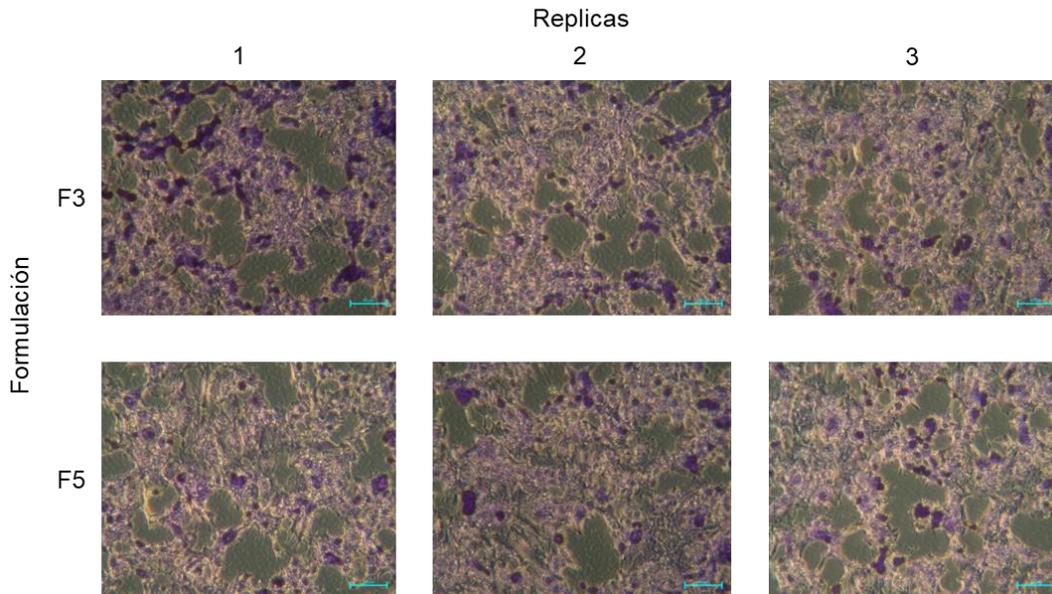


Figura 24. Células A549 transducidas con 100 μ l de las formulaciones DPI3 y DPI5 a las 96 h por triplicado teñidas con cristal violeta vistas a un objetivo 10x.

Tabla 20. Porcentaje de viabilidad de cultivos celulares transducidos con DPI3 y DPI5 + controles positivos y negativos.

Condición	%Viabilidad
HEK293(-)	98
HEK293/Ad5-NPv30-3	33
A549(-)	95
A549/Ad5-NPv30-3	62
A549+DPI3	68
A549+DPI5	73

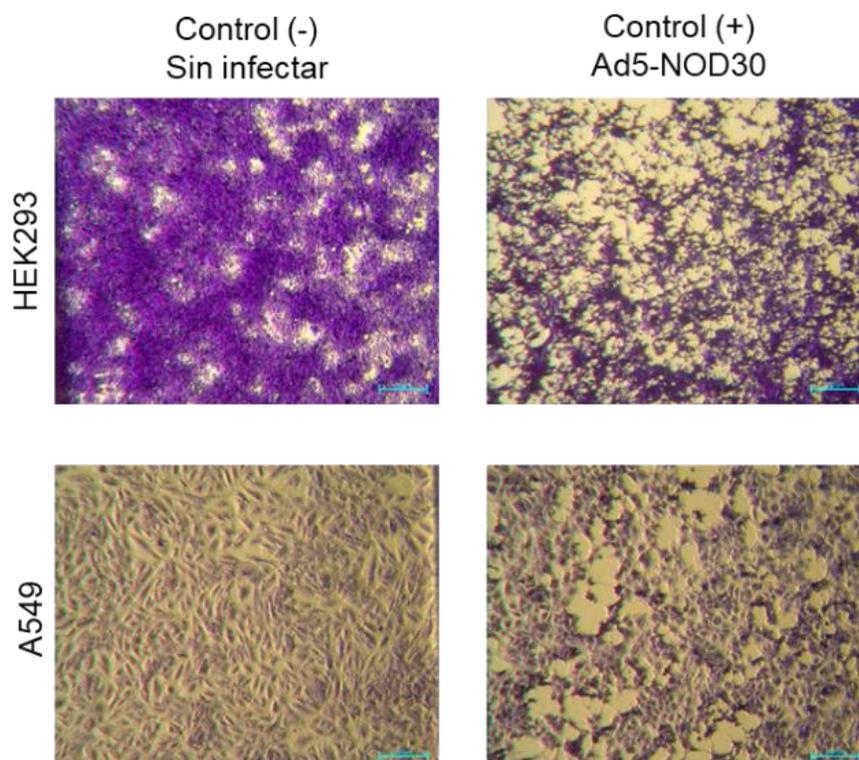


Figura 25. Células A549 infectadas con Ad5-NPv30-3- MOI 30 a las 72h teñidas con cristal violeta vistas en un objetivo 10x.

Asimismo, se realizó la determinación de la viabilidad celular por el método MTS para las 2 formulaciones (DPI 3 y DPI5) a 3 concentraciones diferentes de título viral; 2×10^4 , 5×10^3 y 5×10^2 PFU/mL para cada una, más el control positivo Ad5-NPv30-3 a una MOI de 30 y un control negativo sin infectar (-).

Los resultados de viabilidad se muestran en la **Figura 26**. Se observa que el control positivo, es decir el vector que expresa NPv30-3 reduce la viabilidad hasta en un 60% en modelo de cáncer pulmonar A549 *in vitro*. Se obtuvo una reducción de la viabilidad celular del 40% para el caso de DPI3 y del 30 % a un título de 2×10^4 PFU/mL comparado con un 80 y 90 % para las dos concentraciones probadas de DPI3 y una reducción de tan solo el 10% de la viabilidad para DPI5. Estos resultados demuestran que DPI3 a una concentración de 2×10^4 PFU/mL mantiene la propiedad infectiva en cultivo A549 mostrada previamente en la **Tabla 22**, donde se obtuvo una reducción de la viabilidad en modelo de cáncer pulmonar de hasta un 32% comparado con el ensayo por MTS de hasta un 35% en la reducción de la viabilidad, sin embargo, para la DPI5 a la misma concentración en PFU/mL se obtuvo un valor

promedio en la reducción de viabilidad celular del 28% correlacionando con los resultados obtenidos en la **Tabla 22**, que fue de un 27%. Ambas formulaciones a dicha concentración son efectivas en cuanto a mantener la eficacia *in vitro* a pesar del proceso de liofilización, la manipulación de las partículas adenovirales y el estrés térmico.

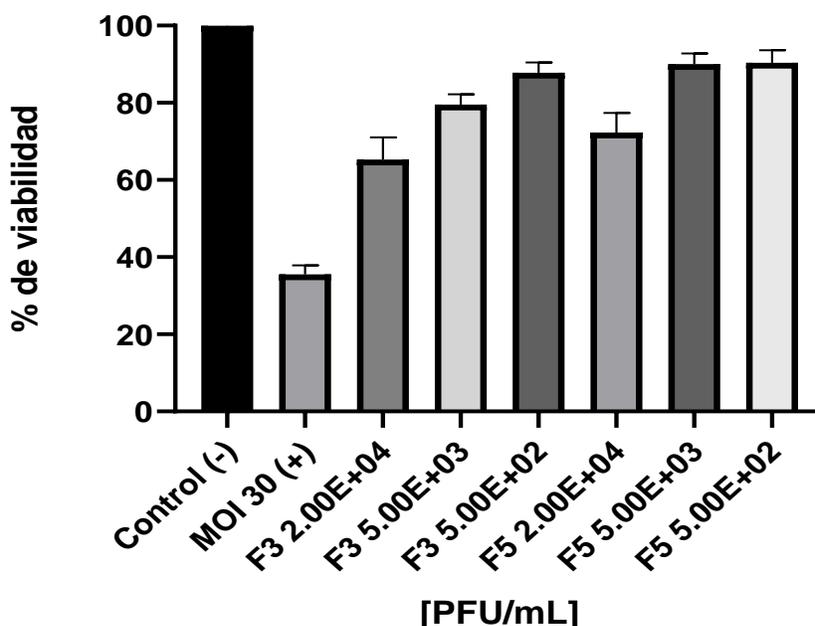


Figura 26. Cultivo A549 transducido con Ad5-Npv30-3- MOI 30 y con DPI3 y DPI5.

10 CONCLUSIONES

En este proyecto se lograron obtener 2 formulaciones como DPIs cargados con el sistema Ad5/NPv30-3 en estado sólido (DPI3 y DPI5) las cuales presentaron propiedades tecnológicas y aerolizables adecuadas para ser administrado por la vía inhalatoria, con un MMAD de $1.05 \pm 0.09 \mu\text{m}$, manteniendo concentraciones de título viral de $5.72 \times 10^5 \pm 1.67 \times 10^4$, para DPI 5 y de $1.26 \times 10^5 \pm 1.69 \times 10^4$, para DPI3 con una capacidad para ser infectivas en un modelo *in vitro* de cáncer pulmonar en cultivo de células A549. Con porcentajes de reducción de la viabilidad del 32 y 27 % para DPI3 y DPI5 respectivamente. Este desarrollo puede ser presentado como un potencial tratamiento de terapia génica para dicha enfermedad.

10.1 Conclusiones particulares

- Se diseñaron 6 formulaciones a partir de la literatura científica, con base en formulaciones de vectores adenovirales bajo procesos de liofilización.
- Se desarrollaron y caracterizaron los polvos liofilizados a partir de las formulaciones propuestas.
- La optimización se logró obteniendo 2 formulaciones liofilizadas como polvo seco potenciales con excelentes propiedades reológicas y de aerolización con un MMAD de aproximadamente $1.05 \pm 0.09 \mu\text{m}$.
- Las formulaciones L3 y L5 lograron proteger al Ad5/NPv30-3 con una pérdida de dos órdenes de magnitud del título viral post- liofilización.
- Los ensayos de infectividad *in vitro* en cultivo de células A549 de las formulaciones DPI 3 y DPI 5 lograron reducir el porcentaje de viabilidad celular hasta un 32%.

11 PERSPECTIVAS

- Desarrollar una formulación a partir de los excipientes de F3 y F5 con la finalidad de mejorar la crioprotección del sistema Ad5/NPv30-3.
- Cargar con el sistema Ad5/NPv30-3 a la formulación resultante entre F3 y F5 y someter a liofilización.
- Evaluar *in vitro* el título viral en células HEK 293 y la viabilidad en células A549 de la formulación resultante entre F3 y F5.
- Llevar a cabo pruebas de estabilidad acelerada a 3 meses de las formulaciones F3, F5 y de la formulación resultante del primer punto.
- Desarrollar un ensayo de inmunogenicidad con la finalidad de simular y observar la respuesta inmunológica generada por las formulaciones.

12 REFERENCIAS

1. ACS. 2018. *American Cancer Society*. Obtenido de <https://www.cancer.org>.
2. Alcalá, S., & Quintanar, D. 2014. La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos. 32-48.
3. Al-Obaidi, H., Granger, A., Hibbard, T., Opesanwo, S. 2021. Pulmonary Drug Delivery of Antimicrobials and Anticancer Drugs Using Solid Dispersions. *Pharmaceutics*, 13, 1056.
4. Amaratunga M, Goralski K, Hoskin DW, Rupasinghe HPV. 2019. Pulmonary Nano-Drug Delivery Systems for Lung Cancer: Current Knowledge and Prospects. *Journal of Lung Health Diseases*. 3(2): 11-28.
5. Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. 2022. *Cancer Chemotherapy*. Treasure Island (FL): *StatPearls*.
6. Andrew, R. 2021. Regional Deposition: Targeting. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*. 34 (1): 1-10.
7. Barkauskas CE, Crouce MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, Randell SH, Noble PW and Hogan BLM. 2013. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *The Journal of Clinical Investigation*. (123), 7, 3024 – 3036.
8. Barry MA, Rubin JD, Lu SC. 2020. Retargeting adenoviruses for therapeutic applications and vaccines. *FEBS Lett*. 594(12):1918-1946.
9. Brambilla, E.; Pugatch, B.; Geisinger, K.; Gal, A.; Sheppard, M.; Guinee, D. 2004. Large cell carcinoma, World Health Organization Classification of Tumours. *Pathol. Genet. Tumours Lung Pleura Thymus Heart*. 10, 45–50.
10. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin*. 68(6), 394–424.
11. Campos F, Carsolio C, Ruin H, Bisseling T, Rocha-Sosa M, Sánchez F. 1995. Characterization and gene expression of nodulin Npv30 from common bean. *Plant Physiology*. 109: 363-370.

12. Campos F, Padilla JE, Vázquez M, Oretag JL, Enriquez C y Sánchez F. 1987. Expression of a nodule-specific gene in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Molecular Biology*. 9: 521:532.
13. Carsolio C, Campos F, Sánchez F y Rocha- Sosa M. 1995. The expression of a chimeric *Phaseolus Vulgaris* nodulin 30-GUS gene is restricted to the rhizobially infected cells in transgenic *Lotus corniculatus* nodules. *Plant Molecular Biology*. 26(6): 1995-2001.
14. Cheer SM, Wagstaff AJ. 2002. Zanamivir—an update of its use in influenza. *Drugs*. 62:71–106.
15. Chen, S., et al. 2012. Investigation on formulation and preparation of adenovirus encoding human endostatin lyophilized powders. *International Journal of Pharmaceutics*. 10 (427), 145– 152.
16. Chen, Y., Liao, Q., Chen, T. et al. 2020. Freeze-drying formulations increased the adenovirus and poxvirus vaccine storage times and antigen stabilities. *Virologica sínica*.
17. Clark, B., Moss, G., Ritchie, J., 1974. The fate of [14C] lactose administered into the lungs of rats and monkeys. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology*. 26, 818–820.
18. Couraud, S.; Zalcmán, G.; Milleron, B.; Morin, F.; Souquet, P.J. 2012. Lung cancer in never smokers—A review. *European Journal of Cancer*. 48, 1299–1311.
19. Croyle Ma; Cheng X, Wilson, J.N. 2008. Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy. *Gene Therapy*.
20. Crystal RG. 2014. Adenovirus: the first effective in vivo gene delivery vector. *Human gene therapy*. 25 (1):3-11.
21. Curran, W.J., Jr. Therapy of limited stage small cell lung cancer. 2001. *Cancer Treat. Res*. 105, 229–252.
22. Dalby, R.N., Tiano, S.L., Hickey, A.J., 1996. Medical devices for the delivery of therapeutic aerosols to the lungs. In: Hickey, A.J. (Ed.), *Inhalation Aerosols*,

- Physical and Biological Basis for Therapy*. Vol. 94. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 441–473.
23. Essa, ML., El-Kemary, MA., Ebrahim Saied, EM., Leporatti, S., Nemanly Hanafy, NA. 2020. Nano targeted Therapies Made of Lipids and Polymers have Promising Strategy for the Treatment of Lung Cancer. *Materials*. 13(23): 5397.
24. Fernández, A & Casan, P. 2012. Depósito pulmonar de partículas inhaladas. *Arch Bronconeumol*. 48(7): 240–246.
25. Flickinger, M.C. 2013. Upstream industrial Biotechnology, 2 Volume set.
26. Franks TJ, Colby TV, Travis WD, et al. 2008. Resident Cellular Components of the Human Lung. Current Knowledge and Goals for Research on Cell Phenotyping and Function. *Proceedings of the american thoracic society*; (5) 763-766.
27. Fröhlich E, Salar-Behzadi S. 2014. Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles: Role of in Vivo, ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies. *Int J Mol Sci*. 15(March):4795-4822.
28. Furyk JS, Grabowski WJ, Black LH. 2009. Nebulized fentanyl versus intravenous morphine in children with suspected limb fractures in the emergency department: a randomized controlled trial. *Emerg Med Australas*. 21-203.
29. Geller DE, Weers J, Heuerding S. 2011. Development of an inhaled drypowder formulation of tobramycin using PulmoSphere technology. *Journal of Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 24:175–82.
30. Ghosh, S., Brown, AM., Jenkins, C, Campbell K. 2020. Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges. *Appl Biosaf*. 1;25(1):7-18.
31. Giberson- Andrea. 2012. Chromatin Structure of Adenovirus DNA Throughout Infection. *Nucleic Acids Research*.
32. Graham FL, Smiley J, Russel WC y Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*. 38(1): 59-74.

33. Griese M, Eismann C, Borner G, Denk O, Schierholz JM, Keller M, et al. 2014. A pharmacokinetics and safety comparison of a highly concentrated tobramycin solution with TOBI. *Journal of Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 27:185–92.
34. Guerin DJ, Kha CX and Tseng KA. 2021. From Cell Death to Regeneration: Rebuilding After Injury. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:655048.
35. Hatefi A, Canine BF. 2009. Perspectives in vector development for systemic cancer gene therapy. *Gene Ther Mol Biology.* 13(A):15-9.
36. He, S., Gui, J., Xiong, K., Chen, M., Gao, H., and Fu, Y. 2022. A roadmap to pulmonary delivery strategies for the treatment of infectious lung diseases. *Journal of Nanobiotechnology.* 20, 101.
37. Hebbink, G.A., Jaspers, M., Peters, H.J.W., Dickhoff, B.H.J. 2022. Recent developments in lactose blend formulations for carrier-based dry powder inhalation. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 189 (114527).
38. Inamura, K. 2017. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front. Oncol.* 7, 193.
39. INCan. 2020. Instituto Nacional de Cancerología. Obtenido de <http://www.incan.salud.gob.mx/>
40. Javadzadeh, Y., & Yaqoubi, S. 2017. Therapeutic nanostructures for pulmonary drug delivery. *Nanostructures for Drug Delivery*, 619–638.
41. Jin, X., Song, L., Ma, C.C., Zhang, Y.C., Yu, S. 2020. Pulmonary route of administration is instrumental in developing therapeutic interventions against respiratory diseases. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(12), 1655–1665.
42. Kamerzell TJ, Esfandiary R, Joshi SB, Middaugh CR, b, Volkin DB. 2011. Protein–excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 63; 1118 – 1159.
43. Kandil, R., & Merkel, O. M. 2019. Pulmonary delivery of siRNA as a novel treatment for lung diseases. *Therapeutic Delivery*, 10(4), 203–206.
44. Katz, MG., Fargnoli, AS., Gubara, SM., Fish, K., Weber, T., Bridges, CR., Hajjar, RJ., and Ishikawa, K. 2019. Targeted Gene Delivery through the Respiratory System: Rationale for Intratracheal Gene Transfer. *Journal of cardiovascular development and disease.* 15; 6 (1): 8.

45. Kenfield, S.A.; Wei, E.K.; Stampfer, M.J.; Rosner, B.A.; Colditz, G.A. 2008. Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. *Tob. Control.* 17, 198–204.
46. Kim, T.K & Eberwin, J.H. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 397 (8), pp.3173-3178.
47. Knight DA, Holgate ST. 2003. The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease *Respirology.* 8, 432- 443.
48. Lacey, L.A. 2012. Manual of Techniques in Invertebrate Pathology Second., Washington.
49. Lad, T.; Piantadosi, S.; Thomas, P.; Payne, D.; Ruckdeschel, J.; Giaccone, G. 1994. A prospective randomized trial to determine the benefit of surgical resection of residual disease following response of small cell lung cancer to combination chemotherapy. *Chest.* 106, 320S–323S.
50. Lee, H., Kwon, Y., Kim, J., Rhee, Y., Chon, J., Park, E., Kim, D., Park, C. 2018. The role of lactose carrier on the powder behaviour and aerodynamic performance of bosentan microparticles for dry powder inhalation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 117, 279–289.
51. Liao QY, Yuan SF, Cao JL, Tang KM, Qiu YS, Seow HC, et al. 2021. Inhaled dry powder formulation of tamibarotene, a broad-spectrum antiviral against respiratory viruses including SARS-CoV-2 and influenza virus. *Adv Ther.* 4:2100059.
52. Lundstrom, Kenneth. 2018. Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases.* 6: 42.
53. Mateu MG. 2011. Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Eng Des Sel.* 24: 53-63.
54. Matthews, H.K., Bertoli, C. & de Bruin, R.A.M. 2022. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 23, 74–88.
55. Meneses, A., Dormond, E., Jacob, D., Tom, R., Bernier, A, Perret, S., Laurent, G., Durocher, Y., Gilbert, R., Kamen, A. 2008. Development of a suspension

serum-free helper-dependent adenovirus production system and assessment of co-infection conditions. *J Virol Methods*. 148(1-2):106-14.

56. Metz, J. K., Scharnowske, L., Hans, F., Schnur, S., Knoth, K., Zimmer, H., Limberger, M., Groß, H., Lehr, C.-M., & Hittinger, M. 2020. Safety assessment of excipients (SAFE) for orally inhaled drug products. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, 37(2), 275-286.
57. Miguel, C. R. 2013. Current treatment in lung cancer. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 611 625.
58. Moulton, J.E. 1978. Tumors in Domestic Animals; University of California Press: Berkeley, CA, USA, pp. 203–205.
59. Mulshine, J.L.; Treston, A.M.; Brown, P.H.; Birrer, M.J.; Shaw, G.L. 1993. Initiators and promoters of lung cancer. *Chest*. 103, 4S–11S.
60. N Stevens & D Prime. 2015. How Particle Size Changes Lung Deposition: A Physical Modeller's Perspective. *Drug Delivery to the Lungs*; 26.
61. Nazrul, I., & Derek, R. 2019. Inhaled Micro/Nanoparticulate Anticancer Drug Formulations: An Emerging Targeted Drug Delivery Strategy for Lung Cancers. *Current Cancer Drug Targets*, 162-178.
62. Newman SP. 2018. Delivering drugs to the lungs: the history of repurposing in the treatment of respiratory diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 133:5–18.
63. Noguchi, M.; Morikawa, A.; Kawasaki, M.; Matsuno, Y.; Yamada, T.; Hirohashi, S.; Kondo, H.; Shimosato, Y. 1995. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer*. 75, 2844–2852.
64. Ok CY, Woda B, Kurian E. 2017. The Pathology of Cancer. In: Pieters RS, Liebmann J, eds. *Cancer Concepts: A Guidebook for the Non-Oncologist*.
65. Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, et al. 2002. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med*; 347-322.
66. Ozturk, S.S & Hu, W.-S. 2006. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies.

67. Petersen, I. 2011. The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch. Arztebl. Int.* 108, 525–531.
68. Pilcer G, Amighi K. 2010. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics.* 392 (2010) 1–19.
69. Promega. 2021. CellTiter 96® One Solution Cell Proliferation Assay. Instructions for use of products G3580, G3581 and G3582.
70. Quinn M, Fannin JT, Sciasci J, Bragg A, Campbell PK, Carias D, et al. 2018. Pentamidine for prophylaxis against *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in pediatric oncology patients receiving immunosuppressive chemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(8).
71. Ramirez M, Graham MA, Blanco-López L, Silvente S, Medrano-Soto A, Blair MW, Hernández G, Vance CP y Lara M. 2005. Sequencing and analysis of common bean ESTs. Building a foundation for functional genomics. *Plant Physiology.* 137: 1211- 1227.
72. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, et al. 1999. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic fibrosis inhaled tobramycin study group. *N Engl J Med.* 340:23–30.
73. Rodríguez-Maxinez, C. 2016. Evaluación de la Transducción del vector adenoviral NPv30-3 sobre la inducción de MCP en células A549: potencial biofármaco en terapia génica contra cáncer de pulmón. Tesis de Licenciatura. UAEM. Cuernavaca, Morelos.
74. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 84: 570-573.
75. Salud, S. d. 2018. *Gobierno de México.* Obtenido de <https://www.gob.mx/salud>
76. Sánchez-Abdallah, U.A. 2017. Determinación de la eficacia en células MCF7 de vectores adenovirales que expresen biofármacos con potencial aplicación en terapia génica. Tesis de Maestría. UAEM. Cuernavaca, Morelos.

77. Shoyele, S. A., & Slowey, A. 2006. Prospects of formulating proteins/peptides as aerosols. *International Journal of Pharmaceutics*, 1-8.
78. Singh S, Kumar R, Agrawal B. 2018. Adenoviral Vector-Based Vaccines and Gene Therapies: Current Status and Future Prospects. *IntechOpen*.
79. Smolle, E.; Pichler, M. 2019. Non-Smoking-Associated Lung Cancer: A distinct Entity in Terms of Tumor Biology, Patient Characteristics and Impact of Hereditary Cancer Predisposition. *Cancers*. 11, 204.
80. Smyth, H.D., Hickey, A.J., 2005. Carriers in drug powder delivery: implications for inhalation system design. *Am. J. Drug Delivery*. 3, 117–132.
81. Sun H.R., Wang S, Yan S.C., Zhang Y, Nelson PJ, Jia H.L, Qin L.X and Dong Q.Z. 2019. Therapeutic Strategies Targeting Cancer Stem Cells and Their Microenvironment. *Front. Oncol*. 9:1104.
82. Sung, Y., Kim, S. 2019. Recent advances in the development of gene delivery systems. *Biomaterials Research*. 23:8.
83. Tamura, T. 2001. New state of the art in small-cell lung cancer. *Oncology* (Williston Park NY). 15, 8–10.
84. Tang, D., Kang, R., Berghe, T.V., Vandenabeele, P and Kroemer, G. 2019. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*. 29, 347–364.
85. Telko, M.J., Hickey, A.J., 2005. Dry powder inhaler formulation. *Respiratory Care*. 50, 1209–1227.
86. Thai, A.A., Solomon, B.J., Sequist, L.V., Gainor, J.F., Heist, R.S. 2021. Lung cancer. *The Lancet*, 398(10299), 535–554.
87. The Journal of Gene Medicine. 2019. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Recuperado el 10 de febrero de 2021, de <https://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical>.
88. Ura T, Okuda K, Shimada M. 2014. Developments in viral vector-based vaccines. *Vaccines* (Basel). 2: 624-641.}

89. Uribe-Toledo, L. 2014. Construcción molecular de vectores que expresen el transgen de NPV30-3 para inducir muerte celular programada en sistemas celulares. Tesis de Maestría. UAEM. Cuernavaca, Morelos.
90. USP. 601 Aerosols, Nasal sprays, metered-dose inhalers, and dry powder inhalers. In: *U. S. Pharmacopeia and National Formulary 25*. 30th ed; 2007.
91. Wong, M.C.S.; Lao, X.Q.; Ho, K.; Goggins, V.B.; Tse, S.L.A. 2017. Incidence and mortality of lung cancer: Global trends and association with socioeconomic status. *Sci. Rep.* 7, 14300.
92. Yamamoto Y, Nagasato M, Yoshida T, Aoki K. 2017. Recent advances in genetic modification of adenovirus vectors for cancer treatment. *Cancer Science*. 108(5):831-837.
93. Zappa, C.; Mousa, S.A. 2016. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. *Transl. Lung Cancer Res.* 5, 288–300.
94. Zhang, et al. 2009. Immunogenicity of lyophilized recombinant adenovirus-based vaccine expressing HIV-1 gagpol in mice. *Life Science Journal*.
95. Zöchbauer-Müller, S.; Pirker, R.; Huber, H. 1999. Treatment of small cell lung cancer patients. *Ann. Oncol.* 10, S83–S91.

13 ANEXOS

13.1 Ensayo de viabilidad celular

Tabla 21. Porcentaje de viabilidad de cultivos celulares transducidos con DPI 3 y DPI 5 + control positivo y negativo por MTS a 3 concentraciones

Control (-)	Ad5- NPv30-3- MOI 30 (+)	PFU/mL					
		F3			F5		
		2X10 ⁴	5X10 ³	5X10 ²	2X10 ⁴	5X10 ³	5X10 ²
94	36	55	79	89	72	92	92
99	36	62	75	85	82	84	91
100	33	68	76	84	74	89	87
101	32	69	82	91	68	93	97
102	36	69	80	85	70	91	89
102	36	71	82	90	72	91	87
102	35	59	81	90	65	89	89
100	40	69	81	88	75	91	91

13.2 Constancias de participación



XV

Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad
de Farmacia
Constituyendo al servicio de la salud

La Facultad de Farmacia de la UAEM a través de su Secretaría de Investigación, Jefatura de Posgrado y Consejo Estudiantil de Posgrado en Farmacia

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: Galindo González Antonio Jese, Alcalá Alcalá Sergio, Meneses Acosta Angélica.

Por la **PRESENTACIÓN DEL TRABAJO LIBRE** titulado:

“Preformulación de un polvo seco Inhalable para Ad5/NPv30-3; estrategia génica para el cáncer pulmonar”

en el 15^{vo} Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia

Celebrado de forma virtual el 29 de noviembre del 2021, Cuernavaca, Morelos

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director
Facultad de Farmacia

Dra. Dea Herrera Ruiz
Secretaria de Investigación
Facultad de Farmacia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DEA HERRERA RUIZ | Fecha:2021-12-09 08:50:15 | Firmante

JfeBFdyUSsP3qOkahGYcGcSKHV2eejPzvVIYGz2ZzkDn7CVO7rbbFT/OHlIGNRNJowJA6kv6E1NosKV4TK1exOkzhsOqhoq8J7BikDp4kdVyz1hVCSywkToHwhTDhTWVCVM5y65OyIdl6pT4gfwVWeXtgvXEnJWIEPIdAarmaGPEnYYWZMwEjBQyVq20NkuwMOe4ytYOEaFngpPBConrupu+YDM4v3ZFDs+ZUlabQvy44AhcSsmo83PqLXALLNqYYPq4z95rtwJusx4+wNJK4HMfOcYfsuJfpaTIOUAmOnBOg1P0e0tUE+WpXCokD9ZR1biMqC--

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2021-12-09 09:24:27 | Firmante

EsZ33x2QWCGBubqRyvQ0lybOrmqOy86+Dw6fMnjGDFUBgs0NG0ecHIMCV60tzkVSBvKSU7SIOqGLasTfMxprPkznLbPzpzX6PNkznEQdSnYB3hw6tV+bh032MesEBIEQOuchYApWAtKwhVwokYoe1IGUgg0SF8LK4ZigRDXTZDy5GsEaENgRk7ido3HrTJK8pYWF5OgDCIm2xV2XPndelUYEYawpxEIDf86okOplhxTOUMpdxzGWf3SeEQvAooVfba53Kd0ZA9RYJGml1+FvyD1Ok7VdBlmU5gVMe+NZeV6AwUtCo4ofO65JKE54PmLKwsJLwWlvaBg--

EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha:2021-12-09 14:06:48 | Firmante

ZqnsH4Dm5CwNddicRFrahjGDjNCH8F6xZbeObPpFQH265OrB35g82sOdCM7xREjdx8xpQe+UUP4BwOWDEgggTR3y+gd3vn9fR9D4wMDR20FVN1/IS4KUZI3ptDUsKxirZq3M8B0N1/S4YY15Wkelsaxa4fCkrXDipy30h5MRbOqWmthHYE7e6NOIs0IuhUY15eslBUT9QjvYucSdvCNKJHfCSXantD69K44IKxQIMOHrUuwjGVoc1mXeirEqbX5qkM2yE0fRzoFJaaYohX4VZzzCFd7aV4fNJI14AvBxQkv683tuxXDfKLI2Ik62Wf4H6JKS+UIQ--

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



qrY9RhQvp

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QaYXNkdWNTew2_Eka3PZEKOVNXbml



Una universidad de excelencia

RECTORIA
2017-2023

Se otorga el presente
RECONOCIMIENTO

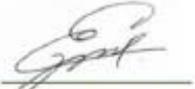
A: Antonio Jese Galindo González, Angélica Meneses Acosta,
Sergio Alcalá Alcalá

Por la presentación del Trabajo Libre:
**Preformulación de un polvo seco inhalable para Ad5/NPv30-3;
estrategia génica para el cáncer pulmonar**

Segundo Congreso Virtual, LIV Nacional y IX Internacional,
"Por la superación Técnica y Científica, hoy y siempre"
Celebrado del 18 al 22 de octubre de 2021.



Dr. Vicente Hernández Abad
Director de la FES Zaragoza, UNAM



Mtra. Cynthia Espinosa Contreras
Dirección Ciencia y Tecnología



Dra. Elizabeth Sánchez González
Presidencia AFM



Dr. Cristian Morales Fuhrmann
Representante de OPS/OMS en México





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad
de Farmacia

Conocimiento al servicio de la salud

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

A través de la Facultad de Farmacia

Hace constar que el/la:

L.F. Antonio Jesé Galindo González

Participó en el ciclo de seminarios de la Facultad de
Farmacia con la ponencia:

**“Desarrollo de una formulación inhalable del Ad5 como estrategia
génica para el tratamiento de cáncer pulmonar mediante la
expresión de la proteína NPv30-3”**

Cuernavaca, Morelos a 30 de agosto de 2021

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director
Facultad de Farmacia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha: 2021-08-27 17:32:25 | Firmante

EMeznsTEp3Yqg4PGP9dWJYHwR3wUSw9E5J8bxEG3bW6KLXIV+3dCkGcS1D2kzQnz58FR7fH45Z0sKkJICYEK8Bs2Jl9bvW7GllrwzhsavdZlP2J3yD9fUNIDvXKpz1L70Vdo1ldYeMUfOqptaBhTRY4rH5gkSSeDBdSV8vI2cx84SkfrqMko5z9tVmmexJDDfUOIQcn6hmGnpylAeRP4+ffHknoSh5TISNM7su825w1j8LFT+plgmMPewz8efL1+SGNmccsPD65eQA5VEOKAFQS8sdJ601Oblo08WsysW8vY4ekneaM54FMKZKGBR+odadGPq3A==

EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha: 2021-08-27 18:41:28 | Firmante

VY5+WHzwCaog+U33A0XDZDXasODGTG984z5uJF1KINSFXJ0DymelnkydSvsrUkly4Pas/hdvsX2/llrncQcO1h427to/vs095xlbNRcTUJ4jsEM8n4ea362KTPWmCx+8lj1FJFBMyb9QeEaTMMWzKF1Jew7/vzNoyI2qYcYK34Kop1/ydG0NZlle1fVAeqtzV3k25Oo456mNGxX130AOemdkguMvQpuQF8nJqLBG2paYe0mTmg1klpkSVLd45arAovKqGODM6CTIs/wtqs8khcSH6VnQtOmVhSTzLMj9KdUKS7PbQ2Y2ShMSFR4Yc9/wHbNj3ZeP102+3w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



czvDHA

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mSANFeWwV33FCVes6112YPwXw3Zm44>



XIV ENCUENTRO DE ESTUDIANTES DE POSGRADO EN FARMACIA



La Facultad de Farmacia a través de la Secretaría de Investigación, la Jefatura de Posgrado y el Consejo Estudiantil de Posgrado

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: Galindo-González Antonio Jesé, Herrera-Ruiz Dea, Bermúdez-Morales Víctor Hugo, Meneses-Acosta Angélica, Alcalá-Alcalá Sergio

Por la PRESENTACIÓN DEL TRABAJO LIBRE titulado

“DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN INHALABLE DEL AD5 COMO ESTRATEGIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER PULMONAR MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA NPV30-3.”

en el 14vo. Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia

Celebrado de forma virtual el 27 de noviembre del 2020, Cuernavaca, Morelos

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director
Facultad de Farmacia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Coordinador Comité Organizador



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRONICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha: 2020-12-04 16:47:31 | Firmante
p8YlpwYISFHytd6VIDsRemosNeQ4F40SFJ04uydJHhbywLLPkSwFoGL54e8KXmnc2m2800NERHv+XMeT4PsUYu4jBzvRMe2xdpZ83Qv5de1D3eYJ2mR9LhYPhUjgSQLcS09AczrjfrutwftuoaUWJHRDNg2Ogd7dp+81m9jgJLe276Tl2SauWIRFJMDQhMGA2z9GXMOLfjuU01lugxqSb+3D7TmrNXMOGm4W4SHIBwcl3hKUrssQzKMSB+eDdoPNoJ6meX67HKFmKlRodLH53oaf84JsyB7kOMI2yFJCSZjmuJdsCL0MrfJU2CwQDAbg---

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha: 2020-12-04 17:35:25 | Firmante
NiaZCew32aPPT1qiv34s35I5VdhwAmr8Rv6bvq1t4BfFzo56WUPoms4ZS3xB6gRfS8ZGveOvsUDbz2Tl3pG5A8DgU3PdGrDJKU1eWhLsFRSnlChal2QmE8ugWmNHh+yHoZGLnC09UCv6ofLGR4e7nFyeDZ7lIbaFIQ5f9K8mZNOGTUjsHkyZ7bw68QdS9vz42MthvLdryOJORxmNQ2wtd0RMdm6th2wUjDAUVRyLnV8Zohewcf3JqZkpr7mr9nckKwLEin5qyA9a+JsnB+V+2eQQKAZB/PC1mk84tyZqVjg6RIdAd5DBQ46wg4eHBH6w---

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



2JcVqr

<https://efirma.uaem.mx/noReputo/mNH3PEY661j6YYHxyjs8kI2k2a5axE7>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

XIV ENCUENTRO DE ESTUDIANTES DE POSGRADO EN FARMACIA



UAEM
Facultad
de Farmacia
Preservando el servicio de la salud

La Facultad de Farmacia a través de la Secretaría de Investigación, la Jefatura de Posgrado y el Consejo Estudiantil de Posgrado

Otorga la presente

CONSTANCIA

Al: L.F. Jesé Galindo González

Por su participación como ASISTENTE

en el 14vo. Encuentro de Estudiantes de Posgrado en Farmacia

Celebrado de forma virtual el 27 de noviembre del 2020, Cuernavaca, Morelos

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director
Facultad de Farmacia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Coordinador Comité Organizador



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRONICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha: 2020-12-16 20:24:47 | Firmante

oZHwMvsoCpaSoprftqEWNz3CyNqH8J7onQva7DJCYpouDhQpniwHNDV9jogzGRoCRZDU9EFPu9dZNP1DasEhKvHQpFM9W+Qn0q9+O1pNqo+G6Wwp+DMIMoG+HIGGgWILIS3YyL9mshdU83hgoNzKusY3w2PvH5baCMZnEB5gE4zouK0ihNz0LZASZhouEh6MYNsALsryQzAZwV1K89cSjyezZaYg5V3489zmpZowSzDPUCuUeMRWVORuXitS8h7gEkgq8F3ePoagG17CBK1P69IMHOQ5d6zgz37tcUgrns78LzFHi167Bh6R9DTGZ44RjQpxlphUtq5Yw--

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha: 2020-12-17 10:52:40 | Firmante

YCOF1D5gCKHhGqLDshwdQY2NvVQz6zpjvRWQsmD65tQ0x+1fHmcpaxOVNIAyTULuqtonmzrBgG5Og+NYRZl0GwK7xHgst2RYu5PouA5K3TBR5eQ6NEBZnzNNWEGEIX3Obtja6wbPjn5TZ1VTTx6p98KR8NJ7ssgAlZ31FVQoyEIn87]1KUSIO8RTNKMPF+p7Sq2Rw3UMINoU15eIhHXG REYwQae5nH+Y1EefrWheX3Zkxv57D+wCLdEDwbCwZkn0yBwdjRWnt2FqjOIQ1p+VhgA1Zl54hJOLYyIk7m7OWIqvF57YG0C42J9KSTUw3sUwKwaWwM--

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3E6KrH

<https://efirma.uaem.mx/noReputado/WyZ7b86gOCS667QRn70J5uWnuOOXVHO>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Antonio Jesé Galindo González

Título de la tesis: "Desarrollo de una formulación inhalable del sistema de Ad5-NPv30-3 como potencial estrategia génica para el tratamiento cáncer pulmonar"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Dea Herrera Ruiz

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Sí se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-firma UAEM

Firma del miembro del jurado
Dra. Dea Herrera Ruiz

27-10-2022

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DEA HERRERA RUIZ | Fecha:2022-10-26 09:22:48 | Firmante

t8bKgEqUjKMS85k9pwfhPVhe5QXg+fV1pkw3dMpiD7vLOBfj8nB7d++d5eKajs0RwWIIQ8HBIgD7kRkUI44k5HQjWJjQ3nOapsUtLu5G8QM9vXmslHwkmPyu+rhK2mUC
UYFInmF8HUsnTgihmBt/zDEFW80P+nFr4k/jk9LhpMSYukblTKslLcjmU45OdzKuGOTwd+mcJ1jjYJJa2uUvkogfBJzoNBZdNycwp7NMbwm7peSqYJ/TojzXJPvm5IUC8kX
wwfdvhHVRny/2igtU/edAzOVppLktQnCW0IZWd2HQXIIQGEvPZXQvxQPEikape+mRXUJYH3TI8nSg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



nZceKE0z4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/r899QipX7cXQyMCn1OjmmK4BuxzHoCUS>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Antonio Jese Galindo González

Título de la tesis: “Desarrollo de una formulación inhalable del sistema Ad5- NPv30-3 como potencial estrategia génica para el tratamiento de cáncer pulmonar”

Grado a obtener:

<input checked="" type="checkbox"/>	Maestría en Farmacia
<input type="checkbox"/>	Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Julio César Rivera Leyva

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

<input checked="" type="checkbox"/>	Si se aprueba tal como se presenta
<input type="checkbox"/>	Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

06 de octubre del 2022

Dr. Julio César Rivera
Leyva

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JULIO CESAR RIVERA LEYVA | Fecha:2022-10-06 21:17:49 | Firmante

KcDrqrTm4WTEHluDX99nQpu1wRb0OpyWm7ilNENsv0CDUAg/H6rY+dvWKBvxij1MdZ/1Upzm1obULNyS+2XK3twiElyNh6bpA4P4tgtvnfiMicf7oxkh65FV6GkgsR7lvQkrfwehX
CbCH5mmG7JKOr+DPnJ28YRb9zRbelkWesyilAk33UXQZbgBAIPTz2wKDATyowDKdrbMyY5M6BXIS3VsKzbnDcPL/B7DdbFQBjWJRQCzL3y3jr/Xhn7W8PKJTwk5uobK2PN6
mMvVd323RjD3ZG9/DKRFP9I0qtuf3PB00HCI4+Q8UdK2WpgUcZvYQJb/hEdYET/jfnPm0LbDg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



GQ1xaj2E

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/J1ZcNzBzfouTVAbACTHrSkigXyP4Ympo>

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALBERTO BERNAL CHAVEZ | Fecha:2022-10-27 11:41:30 | Firmante

hxr114JVhjdPw6RNzQ+ODoEBzm3Te18xuVHYgyVqM0L8BoEiHDt+0fRwOvYdExxHRcU8WdMh8Z1WouEk6CXRp9isjie2mgF+3NxdpVEY1wrOAIgypXFbcGhcmWNvu5V
O3zHB51Zoca3VfQrANcEbSpDUm23HfnpY5TuPLfnDnbzaSLW0ggYhjQOt0KAF4Zx1aLmMv8Z7CM7sM7r9AZp5oGyUPzwDNii1HVpuZdREIGyT1WZos2vdn3er9gxtlpbzuk
bqoigUq745MZdrzzOLNIRxVRXEKIBI7ZEU3SnUw2tQtD4BjM/6Z4b7CXOTn+Bz+p8od0A7IIBaS+d86w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



RmDWK6Co8

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pdA83vuptWCVE7CyNz8khzlg0BfHIVa9>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Antonio Jesé Galindo González

Título de la tesis: "Desarrollo de una formulación inhalable del sistema de Ad5-NPv30-3 como potencial estrategia génica para el tratamiento cáncer pulmonar"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: cDr. Carlos Alberto Tavira Montalván

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-firma UAEM
Firma del miembro del jurado

27-10-2022
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CARLOS ALBERTO TAVIRA MONTALVAN | Fecha:2022-10-31 10:21:40 | Firmante

v73eUKkHJPIXruUptynWxfRoCJk5YQBRT1hZfO8g2n/8LuibvNx5UXkxct+H0jiS3SnX8Fh9jvbcDd6WxzXxL2n0g196wfiQJcpbQo1VRK0rDyrIvOzoBXr1C99awZMkzJW5En4y4HYyewuLdpjFGOhFMBAqCMnCV5mCThOyEBn+IRuim4MHLj5L8HT/PdrRljkIhECE2jOdZ27grO/Bj1KNyBKE8+wZBGIDTvJqfGr1dBmK0mij0VZLS6DMMj/UTPBYP+pt+e7LaBEOJO3hr1AWWP+ZjEkgz8+D4IF8xCzOUeXoizH7ReiV7B0pSW2IPcsrR/0cwnqJy7tVyg3pQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[jcpNing5q](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EtwHJM70RsmQViB3ISn3BNKODsuzUher>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Antonio Jesé Galindo González

Título de la tesis: "Desarrollo de una formulación inhalable del sistema de Ad5-NPv30-3 como potencial estrategia génica para el tratamiento cáncer pulmonar"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Angélica Meneses Acosta

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Sí se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-firma UAEM
Firma del miembro del jurado

27-10-2022
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANGELICA MENESES ACOSTA | Fecha:2022-10-28 19:39:23 | Firmante

YumG4JcU3I5O1Y6LIEnKwpl+cmpNqnLBUlp9VwUxoGPnvcGwxJ1vazLIN6cpJBXcISU2RhFHbYI4nzNApNRz+Uwf+D/4wdoYHK0LzV5Gn7wN7WMSX7D38QWu9POTY3/ScI67+3Y/+ahQVbDLD3Wtqhnr2ku3v21izcxhK9EszZVeYR3DlsgXDBtUmRb92o7Y+cU3eHbrWdpceZJurfvnWMnkz0d/BjmG2G/4lyB0siJOTPVtXe3+R9dTUNP2i/F9x0D+aOzqRPOvF4O3fHJ+Cz9wBGJUHhDCZK2SQdR6A36/EhBenxQPUIhfZi1RnXwoUWII29ul4QTvCcvjg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



7RgeFUXjP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1xxHozzTB7nlycSZQNNBA5sbhLCmPt9U>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023