

- San Cristóbal de La Laguna -

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Estudio de las características que condicionan la fagocitosis de nanopartículas híbridas

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica

Alba Domínguez Hernández

- Curso 2020/2021 -

Tutora: Carmen M. Évora García

Co – Tutora: Patricia Díaz Rodríguez



Facultad de Farmacia
Universidad de La Laguna

ÍNDICE

1. Abstract	3
2. Resumen	3
3. Introducción	4
4. Objetivos	7
5. Materiales y métodos	8
5.1. Materiales	8
5.2. Elaboración de nanopartículas híbridas: método convencional	8
5.2.1. <i>Preparación de las fases</i>	8
5.2.2. <i>Formación de las nanopartículas</i>	10
5.3. Caracterización de las formulaciones	10
5.4. Ensayo de internalización	10
6. Resultados y Discusión	12
6.1. Caracterización de las nanopartículas híbridas	12
6.2. Efecto de la carga superficial sobre la fagocitosis	13
7. Conclusiones	15
8. Bibliografía	16

1. ABSTRACT

The use of hybrid nanoparticles is leading to the development of new pharmaceutical formulations with improved properties over traditional pharmacotherapy. These systems present higher control over drug's pharmacokinetic and higher specificity. In addition, they allow to take advantage of new molecules and/or therapeutic targets, including the intracellular ones. In this sense, it is important to study the nanoparticles characteristics that control their interaction with cells and their internalization. In particular, this work is focused on the evaluation of the surface charge effect over the hybrid nanoparticles phagocytosis process. For that, nanoparticles with different surface charges have been elaborated and an internalization test was performed in murine macrophages. The results showed a greater internalization of the negative nanoparticles and an increase in internalization with the incubation time. The reason behind the increased phagocytosis of anionic nanoparticles in macrophages could be related to the ability of these cells to phagocytose bacteria, whose surface charge is negative.

2. RESUMEN

El empleo de nanopartículas híbridas está abriendo paso a nuevas formas farmacéuticas que presentan mejoras frente a la farmacoterapia tradicional, como un mayor control sobre la farmacocinética o una mayor especificidad. Además, éstas permiten emplear nuevos principios activos y/o dianas terapéuticas, incluyendo las intracelulares. En este sentido, es relevante estudiar las características que intervienen en la interacción de dichas nanopartículas con las células y su internalización. Concretamente, este trabajo se centra en evaluar el efecto de la carga superficial de las nanopartículas híbridas sobre la fagocitosis, elaborando para ello nanopartículas con diferente carga y realizando un ensayo de internalización en cultivos celulares de macrófago murinos. Los resultados mostraron una mayor internalización de las nanopartículas negativas y un incremento de la internalización con el tiempo de incubación. La razón por la que la fagocitosis de nanopartículas aniónicas se ve favorecida en macrófagos podría ser la capacidad de estas células para fagocitar bacterias, cuya carga superficial es negativa.

3. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el desarrollo de la nanotecnología se ha visto potenciado, destacando los sectores de la biomedicina y la industria farmacéutica en lo referente a la investigación de nuevas terapias clínicas y formulación de fármacos^{1,2}. En este sentido, el empleo de nanopartículas (NPs) en el ámbito de la medicina ha demostrado su utilidad, no solo en el tratamiento de diferentes enfermedades cancerígenas, cardiovasculares, óseas o metabólicas, como pueden ser la diabetes o la osteoporosis, sino también en el desarrollo de vacunas y pruebas diagnósticas, entre otros^{3,4}. Las NPs se han convertido en una herramienta versátil para la administración y liberación de fármacos ya que permiten encapsular y transportar una gran variedad de moléculas habitualmente inestables, como péptidos o ácidos nucleicos, mejorando su absorción y biodisponibilidad, reduciendo su aclaramiento, ofreciendo protección frente al sistema inmune, mayor especificidad y control sobre la liberación, disminuyendo las reacciones adversas y mejorando la eficiencia del tratamiento^{2,3,5}.

Para comprender en qué consiste la nanotecnología y qué avances supone con respecto a las formulaciones tradicionales, es necesario conocer el concepto de nanopartícula (NP) como sistema de liberación de fármacos, que se define como aquel sistema cuyo diámetro se encuentra entre 10 nm y 500 nm constituido por diferentes materiales orgánicos y/o inorgánicos, capaz de transportar y liberar principios activos a sus dianas terapéuticas, ya sean intra o extracelulares^{3,6}. Se pueden encontrar diversos tipos de nanopartículas, entre los que destacan los liposomas y las nanopartículas poliméricas por ser los más empleados hasta el momento, no obstante, debido a que presentan ciertas desventajas como baja estabilidad y reproducibilidad y, en determinadas ocasiones, especificidad así como problemas de toxicidad y de encapsulación de fármacos (las NPs poliméricas generalmente incorporan solo principios activos hidrofóbicos)⁷, han surgido las NPs híbridas, que combinan características de ambos sistemas con el fin de evitar sus inconvenientes^{6,8}. Estas están compuestas, como se muestra en la *Figura 1*, por un núcleo polimérico, cuya función es contener el principio activo y una cubierta lipídica, que proporciona estabilidad y ofrece protección frente al sistema inmune, alargando el tiempo de circulación tras su administración sistémica⁶.

El desarrollo de NPs híbridas conlleva una serie de ventajas con respecto a los liposomas y a las nanopartículas poliméricas ya que, de forma resumida, ofrecen mayor estabilidad y biocompatibilidad gracias al núcleo y a la cubierta respectivamente. Esta última presenta un comportamiento similar al de las membranas celulares⁷ y admite modificaciones, entre ellas,

la introducción de grupos funcionales, que permiten la optimización de la interacción con diferentes moléculas orgánicas⁶. Además, estos sistemas permiten incorporar tanto principios activos hidrofóbicos como hidrosolubles, incluso de manera simultánea, gracias al empleo de lípidos con carácter anfifílico, lo que mejora la eficiencia de encapsulación^{7,9}, pudiendo suponer un avance en el manejo terapéutico de muchas enfermedades.

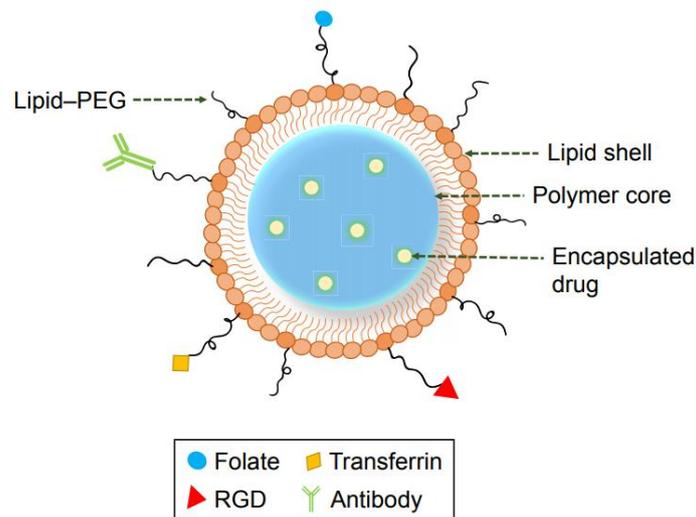


Figura 1. Estructura de una nanopartícula híbrida. Imagen tomada de Mukherjee y colaboradores. Int J Nanomedicine. 2019 – 14 – 1937 - 52¹⁰.

Sin embargo, el diseño y síntesis de NPs presenta tres aspectos críticos desde el punto de vista terapéutico: minimizar la toxicidad, promover la biocompatibilidad y asegurar su internalización y efecto en las dianas intracelulares. De hecho, atravesar las membranas biológicas es uno de los grandes retos de la nanotecnología ya que estas constituyen barreras complejas debido a su función protectora¹¹. Por lo tanto, tal y como se resume en la *Figura 2*, resulta relevante estudiar los factores que condicionan la internalización de las NPs, como pueden ser las propiedades fisicoquímicas, la composición, el tamaño, la forma, la hidrosolubilidad, la funcionalización de la cubierta y la carga superficial, destacando este último, no solo por su importante papel en la captación celular, sino también en la biodisponibilidad y absorción¹².

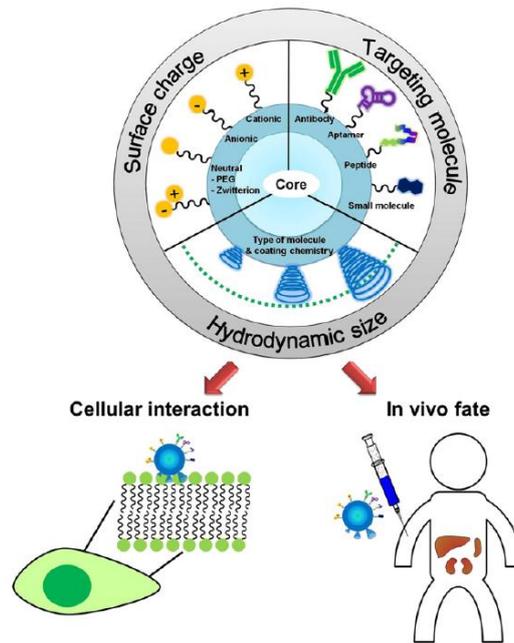


Figura 2. Importancia del control de las características superficiales de las NPs. Imagen tomada de Nam y colaboradores. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 - 65(5):622-4813.

En un principio, es lógico considerar que aquellas NPs con una carga superficial positiva, capaces de unirse a grupos aniónicos de la superficie de las células, presentarán una mayor afinidad por las membranas celulares y por tanto un nivel de internalización superior que aquellas con carga negativa o neutra, cuya interacción no se verá favorecida¹¹. Sin embargo, se ha visto que las células fagocíticas, destinadas a ingerir bacterias (cuya superficie posee carga negativa), presentan una elevada captación de NPs aniónicas¹⁴. Del mismo modo, se han encontrado células no fagocíticas capaces de internalizar NPs negativas mediante mecanismos inespecíficos por los que interactúan con moléculas catiónicas de las membranas. Por lo tanto, no se puede establecer una carga superficial óptima que determine la introducción de NPs en el medio intracelular, sino que esto dependerá, entre otros factores, del tipo de célula sobre el que se pretenda actuar^{11,12}.

La nanotecnología está abriendo innumerables puertas en el área de la tecnología farmacéutica y la aplicación clínica al permitir mejorar las propiedades farmacológicas de muchos principios activos, disminuir los efectos adversos o reducir la frecuencia de dosis. No obstante, el control de las propiedades superficiales de las NPs, que permiten alcanzar de forma específica la diana terapéutica, sigue siendo un reto para este campo^{1,11}.

4. OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la carga superficial de las nanopartículas híbridas sobre la internalización en células fagocíticas, con vistas a la formulación de sistemas nanoparticulados para terapia génica. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos: (I) elaborar y caracterizar nanopartículas híbridas con diferente carga superficial mediante el método de nanoprecipitación modificada y (II) evaluar la fagocitosis de dichas nanopartículas mediante un ensayo de internalización en macrófagos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

Para la elaboración de las nanopartículas híbridas se emplearon los siguientes reactivos: lecitina de soja: L- α -fosfatidilcolina (95%) (Avanti Polar Lipids) con masa molecular de 775,037 g/mol; DSPE - MPEG₂₀₀₀ (1, 2 - Distearoil - sn - glicero - 3 - fosfoetanolamina - N - [metoxi (polietilenglicol)]; Nanosoft Polymers) con peso molecular de 2000 g/mol; etanol (EtOH) 4% , elaborado con agua MQ y etanol absoluto (Panreac); PLGA (ácido poli (D,L - láctico - co - glicólico) 50:50 (Resomer® RG 502; Evonik) con masa molecular de 7000 - 17000 g/mol y viscosidad intrínseca de 0,22 mg/dl; cloruro de DOTAP (1, 2 - dioleoil - 3 - trimetilamonio - propano) \geq 98% (Sigma - Aldrich) de masa molecular 696,54 g/mol; acetona (Emsure) y cumarina - 6 (Sigma - Aldrich), tritón X - 100 (Sigma - Aldrich).

5.2. ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS: MÉTODO CONVENCIONAL

Para evaluar el efecto de la carga sobre la internalización celular se diseñaron y elaboraron 2 formulaciones de nanopartículas (NPs), con carga positiva y negativa respectivamente, empleando el método convencional de nanoprecipitación modificada¹². Para ello, se prepararon dos fases, una acuosa (Fw) y otra orgánica (Fo), que fueron mezcladas posteriormente para dar lugar a la formación de las NPs híbridas.

5.2.1. Preparación de las fases:

La composición de las NPs se muestra en la *Tabla 1*. La Fw, con un volumen de 10 mL/lote, se preparó con lecitina y DSPE - MPEG₂₀₀₀, ambos disueltos en etanol 4%, mientras que la Fo, con un volumen de 1 mL/lote, estaba compuesta por PLGA, DOTAP (solo cuando se requieran NPs de carga positiva) y cumarina - 6, a una concentración de 4 μ g/mL, como fluoróforo para cuantificar la internalización de las NPs, todos disueltos en acetona.

Tabla 1. Cantidad requerida de cada uno de los componentes por lote.

Componente	Cantidad (mg)
Lecitina	0,2
DSPE - MPEG ₂₀₀₀	0,637
PLGA	5
DOTAP	0,3
Cumarina - 6	0,004

Para la elaboración de la Fw se prepararon, por separado, disoluciones más concentradas de cada componente, con el objetivo de diluirlas posteriormente hasta alcanzar la concentración final deseada, utilizando EtOH al 4% como disolvente.

De este modo, la lecitina se pesó en un vaso de precipitado de 50 mL y se disolvió en el volumen calculado de EtOH al 4%, siendo necesaria la aplicación de calor (65°C), bajo agitación, durante 15 - 20 minutos hasta total disolución, con el vaso debidamente tapado para evitar la evaporación del disolvente. Simultáneamente, el DSPE - MPEG₂₀₀₀ se disolvió en el volumen indicado de EtOH al 4% con ayuda de vórtex y finalmente, se mezclaron ambas disoluciones tomando los volúmenes correspondientes de cada una y completando con EtOH al 4%.

La elaboración de la Fo se realizó de manera similar, utilizando esta vez acetona como disolvente.

Bajo la campana, el PLGA y el DOTAP pesados se disolvieron en acetona con ayuda de vórtex y se añadió, únicamente a la disolución de PLGA, el volumen indicado de cumarina. A continuación, se mezclaron 0,5 mL, tanto de la disolución de DOTAP como de PLGA + cumarina, constituyendo la Fo destinada al lote de NPs positivas y, separadamente, se volvieron a tomar 0,5 mL de PLGA + cumarina y 0,5 mL de acetona para constituir la Fo destinada al lote de NPs negativas.

5.2.2. Formación de las nanopartículas:

Para la formación de las NPs, se vertió la Fo en un vaso de precipitado de 50 mL en agitación, a los que se había añadido la Fw, dando lugar a la formación de las NPs mediante la precipitación del PLGA al entrar en contacto con la Fw y su posterior recubrimiento por una monocapa lipídica auto - ensamblada de manera espontánea¹⁰. A continuación, se mantuvo la suspensión bajo agitación durante 1h para conseguir la evaporación del disolvente y el endurecimiento de las NPs.

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES

La caracterización de la NPs se basó en la medida del tamaño medio, el potencial Z y el índice de polidispersión (PDI), para lo que se empleó un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS), Zetasizer Nano – ZS (Malvern Instruments), realizándose las mediciones por triplicado.

La preparación previa de las muestras consistió en la dilución de 100 µL de cada lote con 900 µL de agua MQ que, posteriormente, se sometieron a ultrasonidos durante 1 minuto.

5.4. ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN

Se empleó la línea celular de macrófagos murinos Raw 264.7 (ATCC). Las células fueron cultivadas a 37 °C y 5% de CO₂ en: DMEM (Medio Eagle Modificado por Dulbecco) con 4,5 g/L de glucosa (Lonza; BioWhittaker), suplementado al 10% con FBS (Suero Fetal Bovino; Linus; de Sudamérica), al 1% con penicilina - estreptomina (Lonza; Bélgica) y al 1% con L - glutamina (Lonza; Bélgica) 200 mM. Cuando las células alcanzaron el 70% de confluencia fueron tripsinizadas con: tripsina al 0,25% con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en HBSS (Solución Salina equilibrada de Hanks). Las células fueron lavadas con DPBS (tampón fosfato modificado por Dulbecco) sin calcio ni magnesio (Lonza), tripsinizadas y contadas en un microscopio invertido empleando una cámara de Neubauer y utilizando el colorante azul tripán al 0,4% (Sigma – Aldrich) para diferenciar las células viables de las no viables.

El ensayo de internalización requirió sembrar las células en placas de 96 pocillos, para lo cual fue necesario tripsinizar y contar las células como se describió anteriormente. El pellet obtenido se resuspendió en 10 mL de DMEM, tomándose luego 20 µL a los que se les añadió el mismo volumen de azul tripán al 0,4%.

Tras realizar el recuento de dos cámaras, se obtuvo una media de 2.660.000 células/mL. Teniendo en cuenta que la placa poseía 96 pocillos y que se quería sembrar cada pocillo con 200 μ L conteniendo 1×10^5 células, se preparó una disolución de 20 mL constituida por 3,6 mL de la disolución de macrófagos y 16,4 mL de DMEM. De esta manera, se rellenó cada pocillo con el volumen correspondiente y se dejó la placa durante 24h en el incubador con el objetivo de que las células se peguen a los pocillos.

Antes de poner en contacto las NPs con las células, éstas se diluyeron siguiendo el esquema representado en la *Tabla 2*:

Tabla 2. Esquema seguido para la dilución de las NPs.

Dilución	Composición
1:10	1) 100 μ L NPs + 900 μ L DMEM
1:25	2) 40 μ L NPs + 960 μ L DMEM
1:50	3) 500 μ L de 2) + 500 μ L DMEM
1:100	4) 100 μ L de 1) + 900 μ L DMEM

A continuación, se retiró 100 μ L de medio de cada pocillo y se añadió el mismo volumen de la dilución correspondiente de NPs, obteniendo finalmente las diluciones: 1:20; 1:50; 1:100 y 1:200. Por último, se incubó la placa a 37°C y se midió la fluorescencia a tiempo 0 y se analizó la internalización pasadas 1h y 4h. Para ello, a 1 y 4 horas se lavaron los pocillos con DPBS por duplicado, de forma que se retiraron las NPs no internalizadas y se lisaron las células con tritón X – 100 al 1%. La fluorescencia emitida por la cumarina – 6 introducida en las NPs se midió con un lector de placas (Biotek; USA).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

En la *Tabla 3* se muestran los resultados obtenidos tras la caracterización de las NPs, representados como la media \pm desviación estándar.

Tabla 3. Valores de tamaño, Pdl y potencial Z obtenidos en la caracterización de las NPs.

	Tamaño (nm)	PdI	Potencial Z (mV)
NPs positivas	159,3 \pm 0,156	0,156 \pm 0,047	+13,8 \pm 0,351
NPs negativas	93,42 \pm 1,78	0,177 \pm 0,014	-29,2 \pm 1,49

Comenzando por el tamaño, se observa que las NPs formadas son inferiores a 200 nm, siendo las positivas mayores que las negativas debido posiblemente a la presencia de DOTAP. El tamaño es un factor influyente, no sólo en la farmacocinética y distribución de las NPs, sino también en la captación celular y acumulación en ciertos órganos, de ahí que sea importante medirlo¹⁵. De hecho, estudios anteriores ponen de manifiesto que el tamaño adecuado para conseguir una mayor internalización por endocitosis se encuentra en torno a los 100 nm, mientras que tamaños superiores a los 200 nm son susceptibles de ser internalizados por fagocitosis¹⁶. De esta manera, la captación de las NPs por el sistema fagocítico mononuclear se verá favorecida cuanto mayor sea su tamaño¹⁷, lo cual resulta interesante si lo que se desea es evitar la fagocitosis y alargar el tiempo de circulación de las NPs.

El índice de polidispersión muestra si se ha obtenido una distribución de tamaño mono (valores próximos a 0) o heterodispersa (valores próximos a 1)¹⁵, siendo el primero deseable al proporcionar una mayor estabilidad de la formulación por vía parenteral. En este caso, las muestras se ajustan a una distribución monodispersa con PdI \approx 0,1.

Por último, el potencial Z muestra la carga superficial de las NPs, crucial para la interacción de éstas con las membranas celulares¹⁵. Como era de esperar, aquellas NPs que poseen DOTAP presentan un potencial Z positivo, mientras que las carentes de DOTAP muestran una carga superficial negativa.

Con todo, los dos lotes de NPs obtenidos por el método convencional presentaron características adecuadas para la realización del ensayo de internalización.

6.2. EFECTO DE LA CARGA SUPERFICIAL SOBRE LA FAGOCITOSIS

Como se explicó anteriormente, la evaluación de la internalización se realizó midiendo la fluorescencia a tiempo 0, equivalente a la señal emitida por todas las NPs en suspensión, a 1 y 4h tras lisar las células, equivalente a la señal emitida por las NPs internalizadas. Se emplearon diferentes diluciones de NPs, descartándose la 1:100 y 1:200 por emitir una señal débil debido a que estaban muy diluidas.

Los datos obtenidos se reflejan en las *Figuras 3 y 4*, en las que se representa el % de internalización frente al tiempo estudiado.

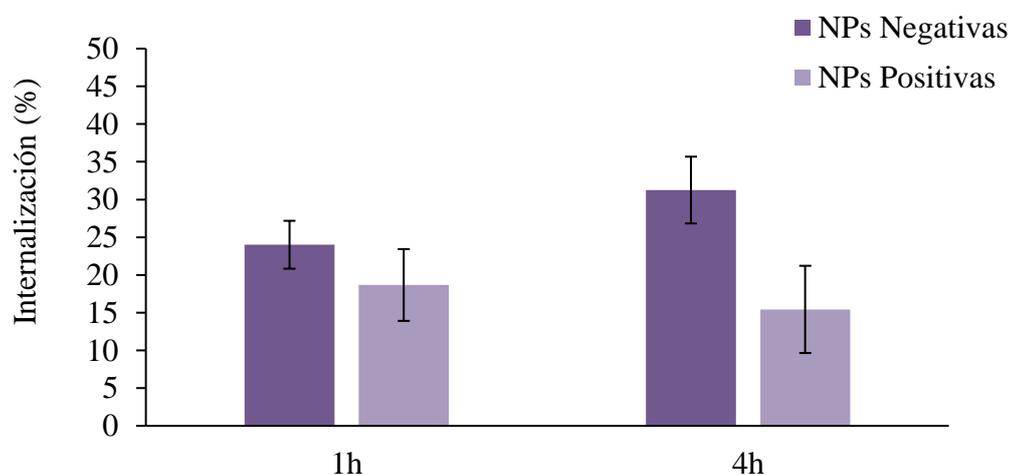


Figura 3. Representación del % de internalización para la dilución 1:20.

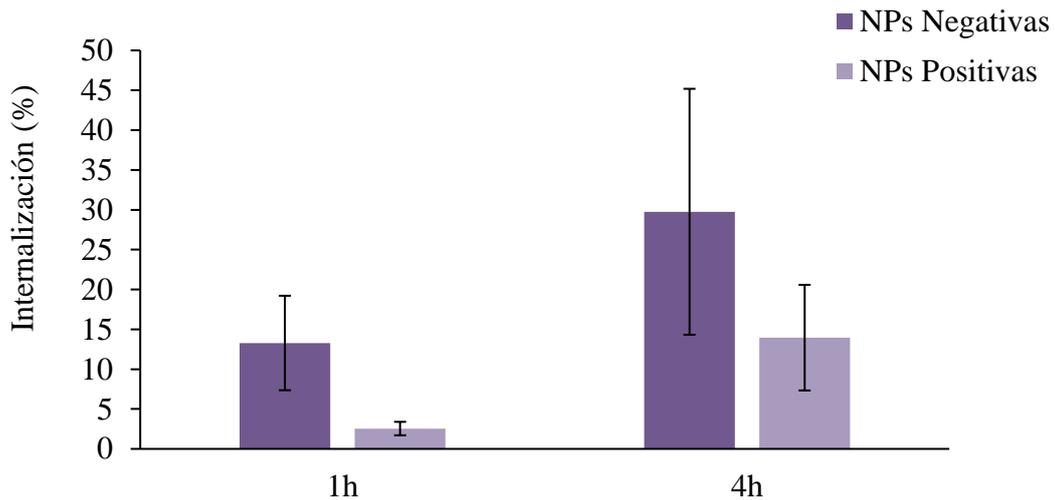


Figura 4. Representación del % de internalización para la dilución 1:50

Aparentemente, las gráficas indican que aquellas nanopartículas con carga superficial negativa presentaron una mayor internalización. Sin embargo, para la correcta interpretación de los datos fue necesaria la realización de un análisis de la varianza (ANOVA), el cual mostró que las diferencias encontradas solo fueron significativas tras 1 hora de internalización en las NPs más diluidas (1:50). El hecho de que las NPs negativas experimentaran una mayor internalización que las positivas puede deberse precisamente a lo que se comentó en la introducción que, a pesar de su pequeño tamaño, las NPs aniónicas ven favorecida su internalización por células fagocíticas, no obstante, existen otros factores no estudiados que también podrían haber afectado a la internalización, por ejemplo, la diferencia de tamaño entre ambos tipos de nanopartículas. Cabe añadir que, como muestran las gráficas, las NPs negativas tienden a aumentar su internalización con el tiempo, mientras que en las catiónicas esto solo se observa con la dilución 1:50. Sin embargo, no se trata de un aumento significativo, pudiendo decirse que la fagocitosis de las nanopartículas no se ve afectada con el tiempo.

7. CONCLUSIÓN

Según los resultados obtenidos del ensayo de internalización, la carga superficial de las NPs híbridas parece afectar de forma significativa en las muestras diluidas, observándose una mayor internalización en el caso de las NPs negativas. De esta forma, las NPs que presentan un mayor potencial para evitar la internalización por células fagocíticas son las catiónicas. Esta formulación podría ser prometedora para su aplicación a nivel sistémico como sistemas nanoparticulados para terapia génica reduciendo su eliminación por el sistema fagocítico mononuclear.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Zhang D, Zhang J. Surface engineering of nanomaterials with phospholipid-polyethylene glycol-derived functional conjugates for molecular imaging and targeted therapy. *Biomaterials*. 2020;230:119646.
2. Shi J, Xiao Z, Kamaly N, Farokhzad OC. Self-assembled targeted nanoparticles: evolution of technologies and bench to bedside translation. *Acc Chem Res*. 2011;44(10):1123-34.
3. Sanità G, Carrese B, Lamberti A. Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization. *Front Mol Biosci*. 2020;7:587012.
4. Mora-Raimundo P, Lozano D, Manzano M, Vallet-Regí M. Nanoparticles to Knockdown Osteoporosis-Related Gene and Promote Osteogenic Marker Expression for Osteoporosis Treatment. *ACS Nano*. 2019;13(5):5451-64.
5. Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008;5(4):496-504.
6. Wakaskar RR. General overview of lipid-polymer hybrid nanoparticles, dendrimers, micelles, liposomes, spongosomes and cubosomes. *J Drug Target*. 2018;26(4):311-318.
7. Mandal B, Bhattacharjee H, Mittal N, Sah H, Balabathula P, Thoma LA, et al. Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine*. 2013;9(4):474-91.
8. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;85(3 Pt A):427-43.
9. Cheow WS, Hadinoto K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;85(2):214-20.
10. Mukherjee A, Waters AK, Kalyan P, Achrol AS, Kesari S, Yenugonda VM. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: state of the art, emerging technologies, and perspectives. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:1937-1952.
11. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*. 2010;6(1):12-21.

12. García-García P, Briffault E, Landin M, Evora C, Diaz-Rodriguez P, Delgado A. Tailor-made oligonucleotide-loaded lipid-polymer nanosystems designed for bone gene therapy. *Drug Deliv Transl Res.* 2021;11(2):598-607.
13. Nam J, Won N, Bang J, Jin H, Park J, Jung S, et al. Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(5):622-48.
14. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:5577-91.
15. Thanki K, Zeng X, Justesen S, Tejlmann S, Falkenberg E, Van Driessche E, et al. Engineering of small interfering RNA-loaded lipidoid-poly(DL-lactic-co-glycolic acid) hybrid nanoparticles for highly efficient and safe gene silencing: A quality by design-based approach. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;120:22-33.
16. Kulkarni SA, Feng SS. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharm Res.* 2013;30(10):2512-22.
17. Donahue ND, Acar H, Wilhelm S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;143:68-96.

