

GRADO EN FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

**ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
PARA SILENCIAMIENTO GÉNICO**

Autor:

Daniel González García

Tutores:

Carmen María Évora García

Araceli Delgado Hernández

San Cristóbal de La Laguna, junio de 2022

Índice

Abstract.....	3
Resumen	4
Introducción.....	5
Objetivos.....	10
Materiales y métodos.....	11
Materiales	11
Elaboración de los núcleos poliméricos.....	11
Elaboración de las nanopartículas híbridas.....	12
Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....	14
Resultados y discusión	15
Conclusiones.....	19
Bibliografía.....	20

Abstract

Hybrid lipid-polymeric nanoparticles are a new drug delivery system that has evoked great interest. They are nanocarriers that combine the positive attributes of both liposomes and polymeric nanoparticles and they stand out for their ability to modify the biodistribution profile, solubility and bioavailability of the encapsulated active ingredient.

Its preparation by conventional methods presents several obstacles such as batch to batch reproducibility and variations in the physicochemical properties. Due to the sensitivity of these production techniques, it is very important to understand what factors influence the process and, therefore, the formation of nanoparticles. Among them we can highlight the nature of pegylated lipids, the type of polymer and the lipid/polymer ratio, which can modify the size, the polydispersity index and the zeta potential.

In this preliminary study, we will proceed to the elaboration of hybrid nanoparticles by modified nanoprecipitation and the optimization of different factors related with the formulation. In this way, it will be possible to establish a formulation with suitable characteristics for the encapsulation of a GapmeR.

The results show that the mean particle size increases linearly with polymer concentration, while the polydispersity index decreases potentially. Likewise, the decrease in the lipid/polymer ratio up to 15% does not produce substantial differences in the physicochemical properties with respect to formulations with a higher ratio. Finally, only a slight decrease in the zeta potential was observed for nanoparticles made with DOPE-MPEG₂₀₀₀ compared to those made using DSPE-MPEG₂₀₀₀.

Resumen

Las nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas son un nuevo sistema de liberación de fármacos que ha despertado un gran interés. Son nanotransportadores que combinan los atributos positivos tanto de liposomas como de nanopartículas poliméricas y destacan por la capacidad de modificar el perfil de biodistribución, la solubilidad y la biodisponibilidad del fármaco encapsulado.

Su elaboración por métodos convencionales presenta diversos obstáculos entre los que destaca la reproducibilidad entre lotes y las variaciones en las propiedades fisicoquímicas. Debido a la sensibilidad de estas técnicas de producción, es muy importante comprender qué factores influyen en el proceso y, por tanto, en la formación de las nanopartículas. Entre ellos podemos destacar la naturaleza de los lípidos pegilados, el tipo de polímero y el ratio lípido/polímero, los cuales pueden modificar el tamaño, el índice de polidispersión y el potencial zeta.

En este estudio preliminar se procederá a la elaboración, por nanoprecipitación modificada, de nanopartículas híbridas y a la optimización de distintos factores relacionados con la formulación. De esta manera, se podrá establecer una formulación con características adecuadas para la encapsulación de un GapmeR.

Los resultados muestran que el tamaño de las partículas aumenta linealmente con la concentración de polímero, mientras que el índice de polidispersión disminuye potencialmente. Asimismo, la disminución del ratio lípido/polímero hasta un 15% no produce diferencias sustanciales en las propiedades fisicoquímicas con respecto a formulaciones de mayor ratio. Finalmente, solo se observó una ligera disminución en el potencial zeta de las nanopartículas elaboradas con DOPE-MPEG₂₀₀₀ en comparación con las preparadas usando DSPE-MPEG₂₀₀₀.

Introducción

El desarrollo de la nanomedicina, especialmente el de nanopartículas, ha despertado un gran interés en la medicina actual, con aplicaciones que van desde agentes de contraste hasta el transporte de genes (1,2). En comparación con los sistemas de liberación de fármacos convencionales, las nanopartículas nos permiten modificar la solubilidad, la liberación del principio activo, la inmunogenicidad, la biodisponibilidad y, sobre todo, la biodistribución y, consecuentemente, la toxicidad (3).

En las últimas décadas, más de 50 sistemas nanoparticulados, incluyendo nanopartículas poliméricas, liposomas y nanocristales, han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (European Medicines Agency, EMA) o se encuentran en ensayos clínicos (2, 4). Entre los distintos tipos de nanotransportadores, los mejor caracterizados son los liposomas y las nanopartículas poliméricas (5).

Los liposomas son definidos como vesículas lipídicas formadas por una o más bicapas en cuyo interior se encuentra un compartimento hidrofílico (5, 6). Estos se forman espontáneamente por autoensamblaje, son biocompatibles y reducen la toxicidad del principio activo encapsulado (1, 7). Sin embargo, estos sistemas vesiculares presentan desventajas tales como poca solubilidad, vida media corta y problemas de estabilidad fisicoquímica y biológica (7, 8).

Por otro lado, las nanopartículas poliméricas suscitan interés debido a su pequeño tamaño y a la posibilidad de modificar el perfil de biodistribución y de liberación del fármaco encapsulado (9). No obstante, las nanopartículas poliméricas también presentan ciertas limitaciones en lo que respecta a su potencial antigenicidad y a aspectos relacionados con la degradación del polímero (10).

Los problemas asociados a los citados nanotransportadores pueden ser reducidos mediante el uso de nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas que combinan los atributos positivos de ambos sistemas (5, 8, 11). Generalmente, estas nanopartículas contienen tres componentes estructurales (figura 1):

- Un núcleo polimérico que encapsula la fracción terapéuticamente activa. El polímero más comúnmente utilizado es el PLGA por su excelente biodegradación y biocompatibilidad (12).

- Una capa lipídica que cubre el núcleo y mejora la biocompatibilidad del sistema. También actúa como barrera para prevenir la salida de los principios activos hidrosolubles y controla la velocidad de degradación del núcleo mediante el control de la permeación del agua hacia el interior (8, 11).
- Una capa externa derivada de la incorporación de lípidos pegilados y de la funcionalización de estos con anticuerpos, aptámeros y/u otras moléculas que permitan una mayor afinidad por las distintas estructuras biológicas (5, 11).

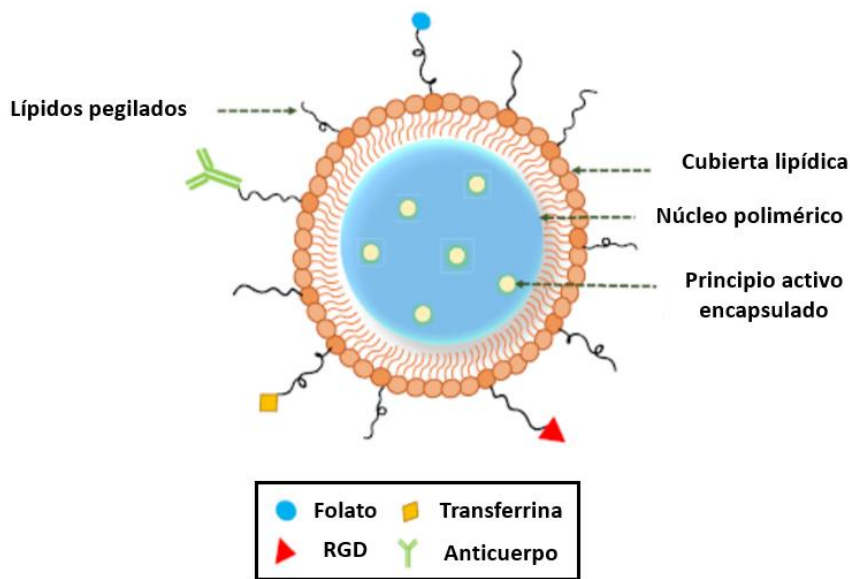


Figura 1. Estructura de una nanopartícula híbrida lipídico-polimérica. En ella observamos el núcleo polimérico con el principio activo encapsulado. Seguidamente se encuentra la cubierta lipídica en la que se incorporan lípidos pegilados y funcionalizados con anticuerpos y moléculas tales como el folato, la transferrina y el péptido RGD (ácido arginilglicilaspartico). Adaptado de Mukherjee et al., 2019 (5).

Sin embargo, la traslación clínica de estos sistemas nanoparticulados ha sido lenta en comparación con los actuales debido a numerosos factores (13). Entre ellos destaca la reproducibilidad entre lotes, la producción a escala industrial y la variación en las propiedades fisicoquímicas (14).

La fabricación por métodos convencionales, tales como la nanoprecipitación, no ha sido del todo exitosa debido a la variabilidad en las condiciones de producción y al mezclado deficiente de las fases (14, 15). Ello es debido a que se trata de procesos de elaboración sensibles, donde cualquier modificación de los parámetros del proceso produce cambios sustanciales en las características fisicoquímicas de las nanopartículas (16, 17).

Entre los factores relacionados con la composición de la formulación que afectan a las características de los nanotransportadores híbridos y que deben ser optimizados se encuentran la relación lípido/polímero, la naturaleza de los lípidos pegilados y el tipo de polímero (11).

La relación o ratio lípido/polímero tiene una función significativa en la estabilidad de la formulación, la biocompatibilidad y la eficacia de encapsulación (18). Las relaciones de lípido/polímero bajas forman nanopartículas no recubiertas en su totalidad, lo que puede dar lugar a la formación de puentes con los lípidos de otras nanopartículas y causar agregación (11). Asimismo, las relaciones altas pueden reducir la eficacia de producción al haber un exceso de lípido que las nanopartículas no pueden incorporar (11). Los lípidos libres se pueden unir entre ellos formando micelas que pueden afectar a la homogeneidad de la formulación (8).

La utilización de lípidos pegilados permite aumentar el tiempo de circulación, reducir la inmunogenicidad y mejorar la estabilidad (19). Esto es debido a que previenen la agregación de las partículas por efectos estéricos y disminuyen la adsorción de proteínas tisulares y séricas (20). Sin embargo, la capa de polietilenglicol (PEG) puede interferir en la endocitosis, que es esencial para la acción de macromoléculas tales como el ARN de interferencia (21). Para conseguir un equilibrio adecuado se pueden emplear lípidos pegilados insaturados, los cuales presentan mayor velocidad de disociación que los lípidos saturados con el mismo número de carbonos en la cadena alquílica (figura 2) (21).

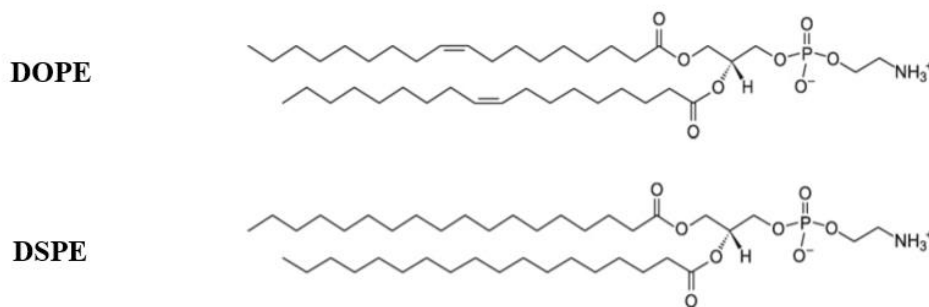


Figura 2. Estructuras moleculares de los lípidos DOPE y DSPE. El DOPE presenta dos dobles enlaces mientras que el DSPE es un lípido saturado, y ambos poseen el mismo número de carbonos en la cadena alquílica. Adaptado de Moghaddam et al., 2011 (22).

Las características del polímero, como su peso molecular y carga superficial, juegan también un papel importante (11). Los polímeros de alto peso molecular pueden dar lugar a nanopartículas más pequeñas que sus equivalentes con menor peso (23), pero estas son menos estables frente a aumentos de la fuerza iónica del medio (11). Por otro lado, la adsorción de lípidos sobre la partícula polimérica depende de la carga superficial del polímero (11). Cuando los lípidos no son capaces de agregarse alrededor del núcleo polimérico debido a la falta de afinidad dan lugar a un aumento en el índice de polidispersión (polydispersity index, PDI) (11).

Todo lo mencionado anteriormente son elementos cruciales para preparar nanopartículas con características óptimas, tales como una vida media adecuada y una biodistribución específica que les permita alcanzar selectivamente los lugares de acción. Entre los parámetros que deben ser cuidadosamente optimizados para conseguir dichos objetivos se encuentran el tamaño medio, el PDI y el potencial zeta (2, 24).

El tamaño es un factor clave que afecta a la eliminación y a la vida media de estos nanotransportadores (24). Las nanopartículas ideales miden entre 1 y 100 nm, lo que les permite tener una vida media prolongada, una menor eliminación hepática y una mayor captación celular (24). Aquellas que miden menos de 10 nm poseen un aclaramiento renal elevado, mientras que las mayores a 100 nm son eliminadas por el sistema mononuclear fagocítico (SMF) (25). El tamaño también influye de manera significativa en la captación celular, ya que está fuertemente correlacionado con los mecanismos de internalización (26) por su capacidad de modificar la unión con los receptores celulares (27).

El PDI es utilizado para describir el grado de uniformidad en el perfil de tamaños de las partículas (28). Su importancia radica en la necesidad de preparar poblaciones monodispersas de estos transportadores para conseguir formulaciones de nanopartículas seguras, estables y eficientes (28). Habitualmente, los valores de 0,2 o menos son considerados como aceptables en la elaboración de nanopartículas poliméricas (28), mientras que PDI superiores corresponden a una mayor dispersión de tamaños en la muestra (29).

La carga superficial también determina la captación celular, la biodistribución y la interacción con los entornos biológicos (30). Se ha observado que la carga catiónica de las nanopartículas se correlaciona fuertemente con una mayor captación celular (31). Sin embargo, aquellas partículas que presentan un potencial zeta positivo pueden inducir una

mayor activación del complemento en comparación con aquellas cargadas negativamente o neutras (24). A pesar de este último inconveniente, las nanopartículas con carga positiva son los sistemas predilectos para el transporte de fármacos o para la terapia génica (32).

Por lo tanto, para preparar estos sistemas es necesario tener en cuenta todos estos aspectos, por su capacidad de influir directamente en su eficacia y citotoxicidad (31).

Objetivos

Este trabajo se engloba en un proyecto presentado para la obtención de la beca de colaboración que, a su vez, es parte de un proyecto financiado (RTI2018-097324-B-I00) cuyo objetivo general es desarrollar una nanoformulación lipídico-polimérica para la administración dirigida de GapmeRs con la finalidad de silenciar ciertos genes implicados en la osteoporosis.

Por tanto, el objetivo perseguido en este estudio preliminar es elaborar nanopartículas híbridas por la técnica de nanoprecipitación modificada y caracterizarlas, así como optimizar distintos parámetros para conseguir nanopartículas con propiedades fisicoquímicas adecuadas. De esta manera, se podrá establecer las bases para desarrollar una nueva nanoformulación lipídico-polimérica para la encapsulación de GapmeRs.

Para ello, nos centraremos en los siguientes puntos:

1. Establecer la concentración de polímero óptima para la elaboración de los núcleos poliméricos. Para ello se emplearán distintas concentraciones de PLGA y se evaluará sus propiedades fisicoquímicas. Concretamente, se medirá su tamaño medio, PDI y potencial zeta.
2. Manteniendo fija la concentración de polímero optimizada, se estudiará la influencia del ratio lípido/polímero en el intervalo de 4,23-23,44%. En función de la caracterización fisicoquímica se determinará el ratio más idóneo.
3. Una vez establecidos los dos parámetros anteriormente citados, se evaluará el cambio de DSPE-MPEG₂₀₀₀, uno de los lípidos usados en la fase acuosa externa, por DOPE-MPEG₂₀₀₀, un lípido insaturado con mayor velocidad de disociación. Seguidamente, se estudiará su efecto-sobre el tamaño medio, PDI y potencial zeta.

Materiales y métodos

Materiales

Para la elaboración de las distintas formulaciones se utilizaron los siguientes productos: ácido poli(láctico-co-glicólico) 50:50 (PLGA) (Resomer® RG 502, Boehringer Ingelheim, Alemania) con peso molecular (PM) de 7000-17000 g/mol; sulfato de protamina (Sigma Aldrich, Estados Unidos) con PM de 5000 g/mol; 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DSPE-MPEG₂₀₀₀) (Nanosoft Polymers, Estados Unidos) con PM de 2748 g/mol; 1,2-dioleol-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DOPE-MPEG₂₀₀₀) (Nanosoft Polymers, Estados Unidos) con PM de 2744 g/mol; 1,2-di-(9Z-octadecenoil)-3-trimetilamonio-propano (sal de cloruro) (DOTAP) (Sigma Aldrich, Estados Unidos) de PM 663 g/mol; L- α -fosfatidilcolina (lecitina o fosfatidilcolina de soja) (Avanti Lipids, Estados Unidos) de PM de 775 g/mol; etanol absoluto (PanReac Química SA, España), y acetonitrilo (Merck Millipore, Alemania).

Elaboración de los núcleos poliméricos

El procedimiento consiste en verter una fase orgánica sobre una fase acuosa para formar una emulsión por agitación magnética.

Para ello:

1. Se prepara una disolución del polímero, en este caso de PLGA (tabla 1) en 1 mL de acetonitrilo que constituye la fase orgánica.
2. La fase orgánica se vierte sobre una disolución acuosa de etanol al 4% (v/v) y se mantiene bajo agitación magnética durante 2 horas en campana de extracción para evaporar el disolvente orgánico y endurecer los núcleos formados.
3. Después de las 2 horas de agitación, se extraen 100 μ l de cada lote para su caracterización fisicoquímica.

En la figura 2 se representa un esquema de las dos primeras etapas de este procedimiento.

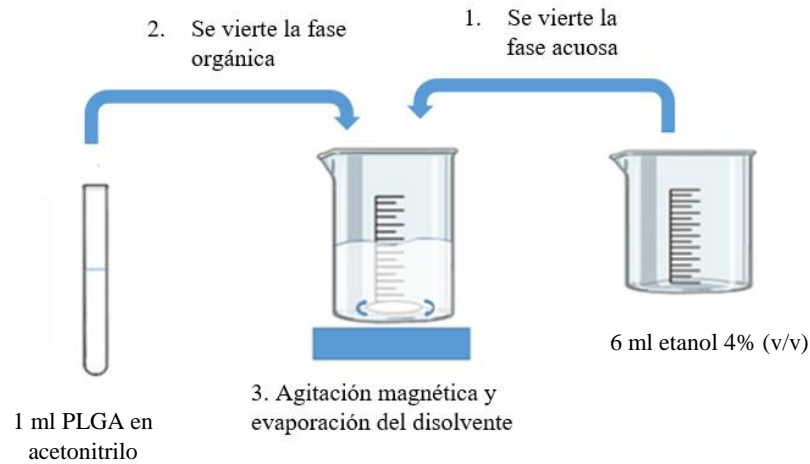


Figura 2. Representación esquemática del proceso de elaboración de los núcleos poliméricos.

Elaboración de las nanopartículas híbridas

El procedimiento consiste en verter una fase orgánica, en la que se incorporaría el Gapmer, sobre una disolución acuosa de los lípidos de la cubierta para formar las nanopartículas lipídico-poliméricas por agitación magnética.

1. Para preparar la fase externa acuosa, se prepara una disolución de lecitina disolviendo la cantidad necesaria de lecitina (tablas 2 y 3) en 4 ml de etanol 4% (v/v) mediante agitación magnética a 65°C, en un vaso de precipitado tapado para evitar la evaporación del etanol. Se deja enfriar, se le incorpora el DSPE-MPEG₂₀₀₀ (tabla 2) o el DOPE-MPEG₂₀₀₀ (tabla 3) disueltos en 2 ml de etanol 4% (v/v) y se procede a su mezcla por agitación magnética.
2. La fase orgánica se prepara disolviendo, por separado, la cantidad necesaria de PLGA (tablas 2 y 3) en 0,5 ml de acetonitrilo y de DOTAP (tablas 2 y 3) en el mismo volumen de disolvente. Se añade la disolución de DOTAP a la de PLGA y, seguidamente, se incorporan 50 µl de una disolución acuosa de protamina a 0,9 mg/ml y se agita. La protamina es un péptido catiónico que se utiliza para condensar los GapmeRs y facilitar su encapsulación en el núcleo polimérico.
3. Esta primera emulsión se vierte sobre la fase externa acuosa y se mantiene en campana de extracción de gases durante 2 horas bajo agitación magnética. En este último paso se recubren los núcleos poliméricos con los lípidos de la cubierta, se evapora el disolvente orgánico y se endurecen las nanopartículas.

Un esquema de este procedimiento se encuentra representado en la figura 3.

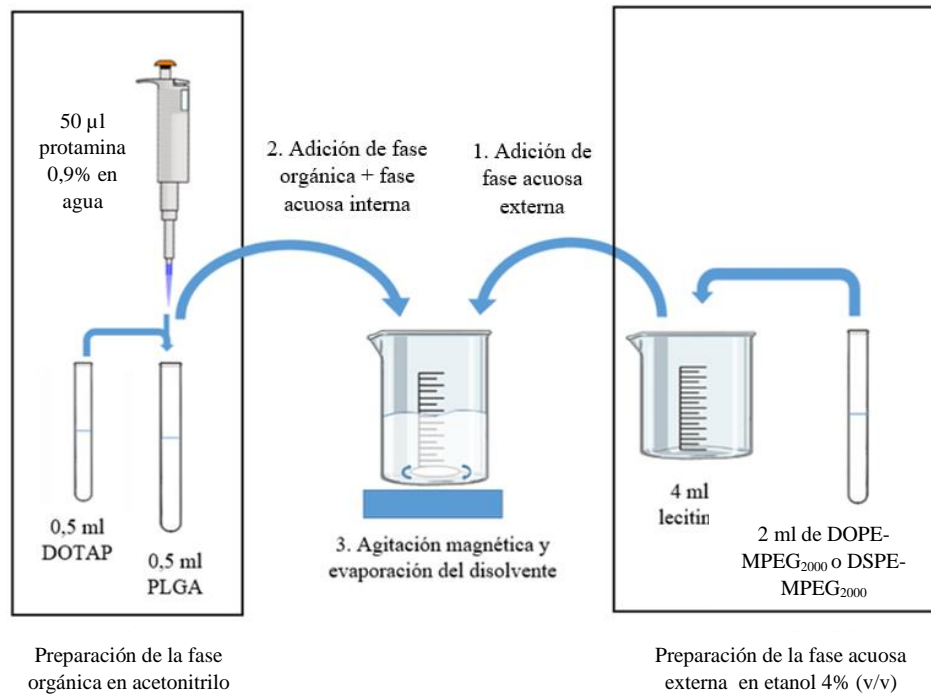


Figura 3. Representación esquemática del proceso de elaboración de nanopartículas híbridas.

4. Una vez transcurridas las 2 horas de agitación, se extraen 100 µl de cada lote para su caracterización fisicoquímica.
5. El resto del lote se concentra por filtración con filtros Amicon Ultra-15 (peso molecular de corte de 100 kDa, Merk Millipore, Alemania) en centrífuga (10 minutos, 10.000 rpm, temperatura ambiente). El concentrado se resuspende en un volumen de 400 µl y de él se extraen 10 µl para su caracterización.

Las composiciones de las distintas formulaciones ensayadas se encuentran descritas en las tablas 1, 2 y 3.

Formulación	Fase orgánica (1 ml de acetonitrilo)	Fase acuosa
1	PLGA 1 mg	6 ml etanol 4% (v/v)
2	PLGA 2,5 mg	
3	PLGA 5 mg	
4	PLGA 10 mg	

Tabla 1. Composición de las formulaciones para la elaboración de núcleos poliméricos.

Formulación	Ratio lípido/polímero	Fase orgánica (1 ml de acetonitrilo)		Fase acuosa externa (6 ml etanol 4% (v/v))		Fase acuosa interna (50 µl agua Milli-Q®)
		PLGA (mg)	DOTAP (mg)	Lecitina (mg)	DSPE-MPEG ₂₀₀₀ (mg)	Protamina (µg)
5	23,44%	2,5	0,15	0,096	0,34	45
6	15%	2,5	0,096	0,0615	0,2175	45
7	10%	2,5	0,064	0,041	0,145	45
8	4,23%	2,5	0,027	0,0174	0,0614	45

Tabla 2. Composición de las formulaciones para la elaboración de nanopartículas híbridas con distintos ratios lípido/polímero.

Formulación	Ratio lípido/polímero	Fase orgánica (1 ml de acetonitrilo)		Fase acuosa externa (6 ml etanol 4% (v/v))		Fase acuosa interna (50 µl de agua Milli-Q®)
		PLGA (mg)	DOTAP (mg)	Lecitina (mg)	DOPE-MPEG ₂₀₀₀ (mg)	Protamina (µg)
9	15%	2,5	0,096	0,0615	0,2175	45

Tabla 3. Composición de la formulación para la elaboración de nanopartículas híbridas con DOPE-MPEG₂₀₀₀.

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

El tamaño medio y la distribución de tamaños fueron determinados mediante la técnica de dispersión de luz dinámica utilizando un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). El potencial zeta también fue determinado en el mismo equipo por la técnica de dispersión de luz electroforética.

Resultados y discusión

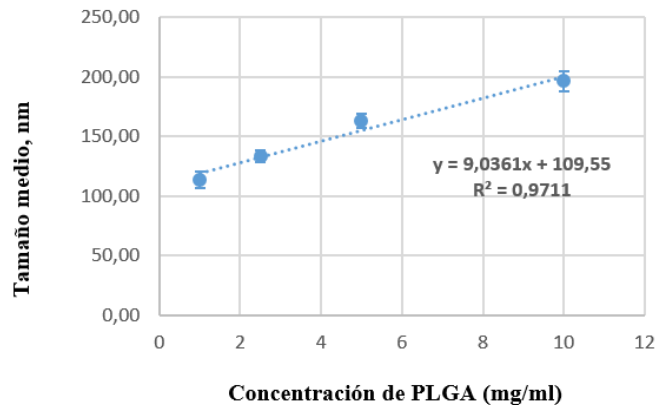
Cabe mencionar que todas las desviaciones estándar obtenidas son debido a tres mediciones repetidas realizadas sobre el mismo lote.

Los núcleos poliméricos se caracterizaron de acuerdo con lo descrito, obteniéndose los resultados indicados en la Tabla 4.

Formulación	Concentración PLGA (mg/ml)	Tamaño medio (nm)	Índice de polidispersión	Potencial zeta (mV)
1	1	113,2 ± 6,96	0,2 ± 0,065	-33,47 ± 0,96
2	2,5	133,07 ± 5,03	0,12 ± 0,018	-27,83 ± 0,81
3	5	163,02 ± 5,58	0,07 ± 0,016	-33,33 ± 0,38
4	10	196,07 ± 8,05	0,07 ± 0,021	-14,81 ± 4,43

Tabla 4. Tamaño medio, índice de polidispersión y potencial zeta de los núcleos poliméricos.

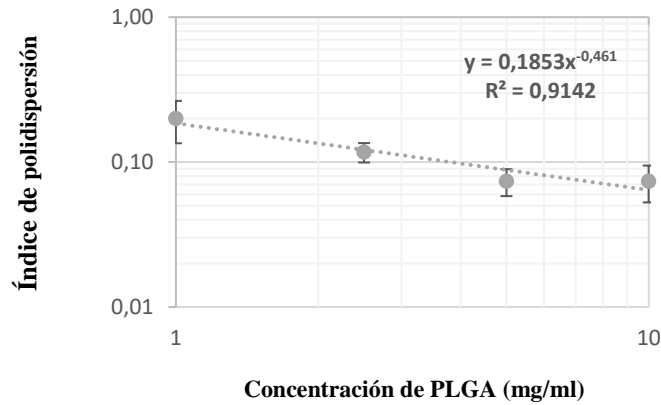
En la gráfica 1 vemos la representación gráfica de los datos de tamaño medio frente a la concentración de PLGA.



Gráfica 1. Influencia de la concentración del polímero sobre el tamaño medio.

Tras realizar la regresión lineal, obtenemos un coeficiente de correlación de 0,9855 y un coeficiente de determinación de 0,9711. A la luz de estos resultados, podemos concluir que el tamaño aumenta de forma lineal con la concentración de PLGA.

En la gráfica 2 se encuentra representado gráficamente en escala logarítmica los datos de PDI y de concentración del polímero.



Gráfica 2. Influencia de la concentración del polímero sobre el índice de polidispersión.

Tras aplicar el modelo de regresión lineal, obtenemos un coeficiente de correlación de 0,9561 y un coeficiente de determinación de 0,9142. De acuerdo con estos datos, se observa que el PDI disminuye potencialmente con la concentración de polímero.

Por otro lado, observamos que los núcleos poliméricos poseen un potencial zeta negativo en el rango de -14,81 a -33,47 mV.

Finalmente, concluimos que, dentro de las formulaciones que producen núcleos monodispersos ($PDI < 0,2$), la que genera los transportadores de menor tamaño es la formulación 2. Debido a ello, las siguientes formulaciones se elaboraron manteniendo la concentración de PLGA en 2,5 mg/ml.

En la tabla 5 se encuentran indicados los resultados de la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas híbridas con distintos ratios lípido/polímero y concentración de 2,5 mg/ml de PLGA, antes y después de concentrar.

Formulación	Ratio lípido/polímero	Tamaño medio (nm)	Índice de polidispersión	Potencial zeta (mV)
5	23,44%	150,13 ± 7,99	0,19 ± 0,01	47,8 ± 1,73
5 concentrada	23,44%	138,33 ± 6,71	0,23 ± 0,03	52,7 ± 2,69
6	15%	161,03 ± 5,14	0,16 ± 0,01	50,6 ± 3,04
6 concentrada	15%	154,97 ± 3,27	0,25 ± 0,02	51,6 ± 0,1
7	10%	281,37 ± 22,7	0,21 ± 0,03	-5,22 ± 1,44
7 concentrada	10%	304,13 ± 41,11	0,4 ± 0,09	-3,06 ± 0,5
8	4,23%	256,53 ± 11,39	0,18 ± 0,005	-4,48 ± 0,25
8 concentrada	4,23%	245 ± 2,96	0,38 ± 0,01	-6,66 ± 0,53

Tabla 5. Tamaño, PDI y potencial zeta de las nanopartículas híbridas elaboradas con distinto ratio lípido/polímero, antes y después de concentrar.

Las formulaciones 5 y 6 con un ratio lípido/polímero de 23,44% y 15%, respectivamente, presentan valores similares de tamaño y un PDI cercano a 0,2 antes y después de concentrar.

Por otro lado, los resultados de las formulaciones 7 y 8 con ratios lípido/polímero de 10 y 4,23%, respectivamente, nos indican que se producen nanopartículas de gran tamaño, polidispersas y con potencial zeta negativo, que posiblemente sean producto de la agregación. Dicho proceso pudo haber ocurrido porque la cantidad de lípido añadido no fue suficiente para recubrir por completo la superficie de los núcleos poliméricos, dando lugar a puentes lipídicos que facilitaron su agregación.

Finalmente, cabe comentar que el proceso de concentración implica un aumento del PDI de todas las formulaciones, sin afectar de manera sustancial al tamaño medio ni al potencial zeta. El incremento del PDI puede deberse a la formación de agregados, los cuales, sin embargo, no los tiene en cuenta el software del equipo de medida para la estimación del tamaño medio (33).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, el ratio lípido/polímero del 15% es el más adecuado, pues permite conservar unas características fisicoquímicas similares a las del ratio 23,44%, pero con una disminución de la cantidad de materiales a emplear.

En la tabla 6 se muestra, de nuevo, los resultados de la caracterización de la formulación 6, elaborada con DSPE-MPEG₂₀₀₀ en la fase acuosa externa, para su comparación con los de la formulación 9, elaborada usando DOPE-MPEG₂₀₀₀. Ambas formulaciones se prepararon con el mismo ratio lípido/polímero (15%) y concentración de PLGA (2,5 mg/ml).

Formulación	Tamaño medio (nm)	Índice de polidispersión	Potencial zeta (mV)
9	157,27 ± 5,21	0,14 ± 0,04	41 ± 2,98
9 concentrada	152,07 ± 5,31	0,21 ± 0,01	34,4 ± 1,04
6	161,03 ± 5,14	0,16 ± 0,01	50,6 ± 3,04
6 concentrada	154,97 ± 3,27	0,25 ± 0,02	51,6 ± 0,1

Tabla 6. Resultado de la caracterización de las nanopartículas híbridas elaboradas con DOPE-MPEG₂₀₀₀ (formulación 9) y con DSPE-MPEG₂₀₀₀ (formulación 6).

No se observan cambios sustanciales entre las dos formulaciones en el tamaño medio, el cual se encuentra próximo a 155 nm; ni en el PDI, que presenta valores cercanos

a 0,15 sin concentrar y 0,2 tras concentración. Solo el potencial zeta de la formulación con DOPE-MPEG₂₀₀₀ es algo menor al de la formulación con DSPE-MPEG₂₀₀₀, aunque se mantiene en valores positivos, superiores a 30 mV.

Estos valores indican que la sustitución de DSPE-MPEG₂₀₀₀ por DOPE-MPEG₂₀₀₀ no supone grandes cambios en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas.

De esta forma, hemos conseguido elaborar con éxito una formulación con DOPE-MPEG₂₀₀₀ que, gracias a su mayor velocidad de disociación con respecto a DSPE-MPEG₂₀₀₀, podría permitir una mayor captación celular del GapmeR encapsulado.

Conclusiones

El análisis de los resultados obtenidos en este estudio preliminar nos permite concluir lo siguiente:

- El aumento de la concentración de PLGA produce un aumento lineal del tamaño de partícula y una disminución potencial del índice de polidispersión. La concentración de PLGA de 2,5 mg/ml permite obtener nanopartículas poliméricas monodispersas de aproximadamente 133 nm.
- La disminución del ratio lípido/polímero hasta el 15% no produce modificaciones sustanciales en las características fisicoquímicas. Por debajo de dicho valor, se producen agregados.
- El ratio lípido/polímero más adecuado es el 15% porque, además de producir nanopartículas similares al ratio 23,44%, es suficiente para cubrir la superficie del núcleo polimérico y se reduce el riesgo de formación de micelas por exceso de lípido.
- La sustitución de DSPE-MPEG₂₀₀₀ por DOPE-MPEG₂₀₀₀ no produce modificaciones en el tamaño medio ni en el PDI. El potencial zeta es solo ligeramente menor, manteniéndose en valores positivos.

Por lo tanto, la formulación elaborada con la concentración de PLGA de 2,5 g/ml, ratio lípido/polímero del 15% y DOPE-MPEG₂₀₀₀ podría potencialmente establecerse como un punto de partida para futuros ensayos de encapsulación de un GapmeR.

Bibliografía

1. Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *IJN* 2007; 2(2):129-141.
2. Zhang L, Chen Q, Ma Y, Sun J. Methods for Fabrication and Engineering of Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Bio Mater* 2020; 3: 107-120. doi: 10.1021/acsabm.9b00853
3. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodríguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnol* 2018; 16(1): 71. doi: 10.1186/s12951-018-0392-8
4. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: an update. *Bioeng Transl Med* 2019; 4 (3): e10143. doi: 10.1002/btm2.10143
5. 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. *IJN* 2019; 14: 1937-1952. doi: 10.2147/IJN.S198353.
6. Liu P, Chen G, Zhang J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* 2022; 27 (4): 1372. doi: 10.3390/molecules27041372
7. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 2013; 8 (1):102. doi: 10.1186/1556-276X-8-102
8. Shah S, Famta P, Raghuvanshi RS, Singh SB, Srivastava S. Lipid polymer hybrid nanocarriers: Insights into synthesis aspects, characterization, release mechanisms, surface functionalization and potential implications. *Colloids Interface Sci. Commun* 2021; 46 (2022): 100570. doi: 10.1016/j.colcom.2021.100570
9. Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh DN et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* 2020; 25 (16): 3731. doi: 10.3390/molecules25163731
10. Jawahar N, Meyyanathan SN. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *Int J Health Allied Sci* 2012; 1: 217-23.

11. Madni A, Tahir N, Rehman M, Raza A, Mahmood MA, Khan MI et al. Hybrid Nano-carriers for Potential Drug Delivery. In: Maiti S, Sen KK, editores. *Advanced Technology for Delivering Therapeutics*. London: IntechOpen; 2017. p. 53-87. doi: 10.5772/66466
12. Wakaskar RR. General overview of lipid–polymer hybrid nanoparticles, dendrimers, micelles, liposomes, spongosomes and cubosomes. *J Drug Target* 2018; 26 (4): 311-318. doi: 10.1080/1061186X.2017.1367006
13. Valencia PM, Farokhzad OC, Karnik R, Langer R. Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 2012; 7 (10): 623-629. doi: 10.1038/nnano.2012.168.
14. Tahir N, Madni A, Li W, Correia A, Khan MM, Rahim MA et al. Microfluidic fabrication and characterization of Sorafenib-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled drug delivery. *Int J Pharm* 2020; 581: 119275. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119275
15. Feng Q, Zhang L, Liu C, Li X, Sun J, Jiang X. Microfluidic based high throughput synthesis of lipid-polymer hybrid nanoparticles with tunable diameters. *Biomicrofluidics* 2015; 9(5):052604. doi: 10.1063/1.4922957
16. Draheim C, de Crécy F, Hansen S, Collnot EM, Lehr CM. A Design of Experiment Study of Nanoprecipitation and Nano Spray Drying as Processes to Prepare PLGA Nano- and Microparticles with Defined Sizes and Size Distributions. *Pharm Res* 2015; 32 (8): 2609-2624. doi: 10.1007/s11095-015-1647-9
17. Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int. J. Pharm* 2017; 532 (1): 66-81. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.064
18. Cheow WS, Hadinoto K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2011; 85 (2011): 214-220. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.02.033
19. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-base drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 99 (Pt A): 28-51. doi: 10.1016/j.addr.2015.09.012.

20. Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond.)* 2011; 6 (4): 715-728. doi: 10.2217/nnm.11.19.
21. Zhu X, Tao W, Liu D, Wu J, Guo Z, Ji X et al. Surface De-PEGylation Controls Nanoparticle-Mediated siRNA Delivery In Vitro and In Vivo. *Theranostics* 2017; 7 (7): 1990-2002. doi: 10.7150/thno.18136
22. Moghaddam, B, McNeil, SE, Zheng, Q, Mohammed, AR, Perrie, Y. Exploring the correlation between lipid packaging in lipoplexes and their transfection efficacy. *Pharmaceutics* 2011; 3(4): 848–864. doi: 10.3390/pharmaceutics3040848
23. Zhang L, Chan JL, Gu FX, Rhee J, Wang AZ, Radovic-Moreno AF et al. Self-Assembled Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticle: A Robust Drug Delivery Platform. *ACS Nano* 2008; 2 (8): 1696-1702. doi: 10.1021/nm800275r
24. Adamo G, Campora S, Ghersi G. Functionalization of nanoparticles in specific targeting and mechanism release. In: Ficai D, Grumezescu A, editores. *Nanostructures for Novel Therapy*. Filadelfia: Elsevier; 2017. p. 57-80. doi: 10.1016/B978-0-323-46142-9.00003-7
25. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol Pharm* 2008; 5 (4): 505-515. doi: 10.1021/mp800051m
26. Barar J. Bioimpacts of nanoparticle size: why it matters? *Bioimpacts* 2015; 5 (3): 113-115. doi: 10.15171/bi.2015.23
27. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond.)* 2016; 11 (6): 673-692. doi:10.2217/nnm.16.5
28. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Davarani F, Javanmard R, Dokhani A et al. Impact of Particle size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018; 10 (2): 57. doi:10.3390/pharmaceutics10020057
29. Clayton KN, Salameh JW, Wereley ST, Kinzer-Ursem TL. Physical characterization of nanoparticle size and Surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics* 2016; 10 (5): 054107. doi:10.1063/1.4962992

30. Jo DH, Kim JH, Lee TG, Kim JH. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine* 2015; 11 (7): 1603-1611. doi: 10.1016/j.nano.2015.04.015
31. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 5577-5591. doi: 10.2147/IJN.S36111
32. Forest V, Pourchez J. Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 70 (Pt 1): 889-896. doi: 10.1016/j.msec.2016.09.016
33. Malvern Panalytical: a spectris company [Internet]. 2014 [acceso 10 de mayo de 2022]. De Nobbmann U. FAQ: Peak size or z-average size – which one to pick in DLS?. Disponible en: <https://www.materials-talks.com/faq-peak-size-or-z-average-size-which-one-to-pick-in-dls/>