

# TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Grado en Farmacia**

**Curso 2023/24**

---

## **Desarrollo de Nanopartículas para administración local en tumores**

---

Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica

**Nerea Victoria Suárez García**

alu0101311890@ull.edu.es

Tutora: Araceli Delgado Hernández

Co-tutora: Patricia García García



## **Índice**

1. Datos referidos a la memoria .....	3
2. Resumen .....	4
3. Abstract.....	5
4. Introducción .....	6
5. Objetivos.....	9
6. Material y métodos.....	10
6.1. Materiales.....	10
6.2. Elaboración de las nanopartículas.....	10
6.3. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....	13
6.4. Ensayo de estabilidad de las nanopartículas.....	13
6.5. Ensayo de encapsulación y liberación del Gapmer.....	13
6.6. Funcionalización de las nanopartículas con anti-CD24.....	14
6.7. Ensayo de internalización de nanopartículas en células.....	14
7. Resultados y discusión .....	15
7.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas.....	15
7.2. Estabilidad de las nanopartículas .....	17
7.3. Evaluación de la eficiencia de encapsulación y liberación del Gapmer.....	20
7.4. Evaluación de la eficiencia de la funcionalización con anti-CD24 .....	20
7.5. Evaluación de la internalización de nanopartículas en células.....	22
8. Conclusiones .....	24
9. Bibliografía.....	25

### **1. Datos referidos a la memoria**

Número de páginas de la memoria	26
Número de palabras totales de la memoria sin contar resumen, abstract, pie de tablas o figuras y referencias.	3490
Número de palabras del resumen	188
Número de palabras del abstract	162

## **2. Resumen**

Las nanopartículas híbridas lípido-poliméricas han supuesto un avance en la administración de distintos tipos de moléculas con fines terapéuticos, entre ellos, los Gapmers. Sin embargo, la administración de nanopartículas por vía sistémica presenta limitaciones, por lo que, lo ideal es la administración local, como, por ejemplo, intratumoral. Para conseguir una administración intratumoral incluso más efectiva, la superficie de las nanopartículas híbridas se puede modificar con ligandos, consiguiendo así una distribución activa mediante la funcionalización.

En este trabajo, el principal objetivo fue la elaboración, por el método de la nanoprecipitación, de nanopartículas híbridas portadoras de Gapmer y la optimización de sus características, incluyendo la funcionalización con anti-CD24, para mejorar su internalización en células.

Los resultados muestran que la incorporación de un surfactante es necesaria para la obtención de nanopartículas con características fisicoquímicas apropiadas. Independientemente del surfactante empleado (albúmina o lípido-PEGilado), la eficiencia de encapsulación del Gapmer es alta. La funcionalización por conjugación química es más reproducible y estable que por adsorción, pero, por otro lado, la funcionalización aumenta el tamaño de las nanopartículas. No se obtuvo un mayor grado de internalización de las nanopartículas con la funcionalización con anti-CD24.

### **3. Abstract**

Hybrid lipid-polymeric nanoparticles have been a breakthrough in the administration of different types of molecules for therapeutic purposes, including Gapmers. However, systemic delivery of nanoparticles has limitations, so local delivery, such as intratumoral, is ideal. To achieve even more effective intratumoral delivery, the surface of the hybrid nanoparticles can be modified with ligands, thus achieving active distribution through functionalization.

In this work, the main objective was the elaboration, by the nanoprecipitation method, of Gapmer-bearing hybrid nanoparticles and the optimization of their characteristics, including functionalization with anti-CD24, to improve their internalization in cells.

The results show that the incorporation of a surfactant is necessary to obtain nanoparticles with appropriate physicochemical characteristics. Regardless of the surfactant used (albumin or lipid-PEGylated), the encapsulation efficiency of Gapmer is high. Functionalization by chemical conjugation is more reproducible and stable than by adsorption, but, on the other hand, functionalization increases the size of the nanoparticles. A higher degree of nanoparticle internalization was not obtained with functionalization with anti-CD24.

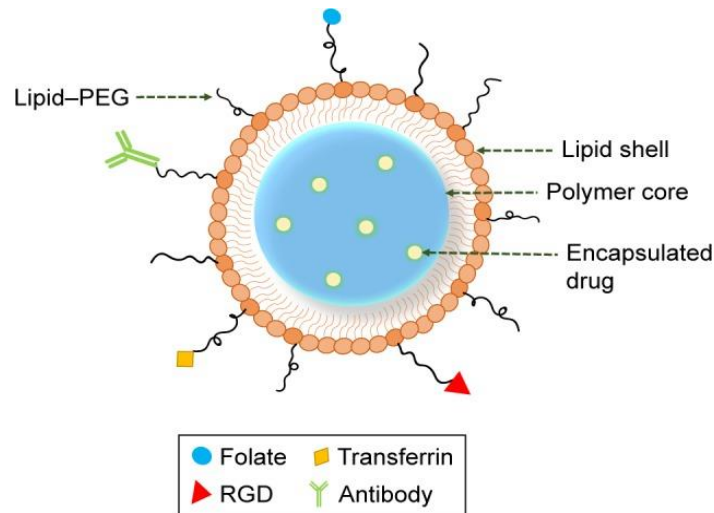
## **4. Introducción**

Las nanopartículas (NPs) son herramientas relevantes en el campo de la medicina moderna, ya que mejoran la administración de distintos tipos de moléculas con fines terapéuticos (1,2).

Dadas las características que presentan las NPs, como su tamaño nanométrico, homogeneidad y carga superficial, son capaces de proteger a los fármacos, aumentar su tiempo de residencia en la circulación o permitir la administración directamente en el lugar a tratar. Por tanto, gracias al diseño de las NPs, se consigue mejorar el índice terapéutico y las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de sustancias activas, consiguiendo una liberación controlada, protección contra la degradación por el sistema inmunitario y reducción de los efectos secundarios (2,3).

Se han logrado grandes avances en el campo de la nanotecnología donde una gran cantidad de nanotransportadores como liposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, etc., han sido aceptados para su uso clínico. Actualmente, las nanoformulaciones más ampliamente estudiadas son las NPs poliméricas y los liposomas, pero tras su uso, se han detectado ciertas limitaciones como la desintegración estructural, un tiempo de circulación limitado, baja tasa de encapsulación y pérdida de acción debido a liberación inespecífica del principio activo (2,3). Por lo tanto, con el fin de superar dichas limitaciones y aprovechar sus ventajas, se han desarrollado las nanopartículas híbridas lípido-poliméricas (NPHLPs) (2). Las NPHLPs están constituidas por un núcleo polimérico que confiere buena estabilidad e integridad física donde se encuentra encapsulado el principio activo, rodeado de una cubierta lipídica que previene la liberación del fármaco y facilita el tránsito de las NPs a través de las membranas celulares (4,5).

Entre los métodos más sencillos utilizados para la preparación de NPHLPs está la nanoprecipitación. Este método consiste en disolver la sustancia activa junto al polímero en un disolvente orgánico miscible en agua y disolver los lípidos en un disolvente acuoso. A continuación, se añade el polímero a los lípidos bajo agitación continua para la formación del núcleo polimérico con autoensamblaje de los lípidos a su alrededor, obteniendo así las NPHLPs (2,6).

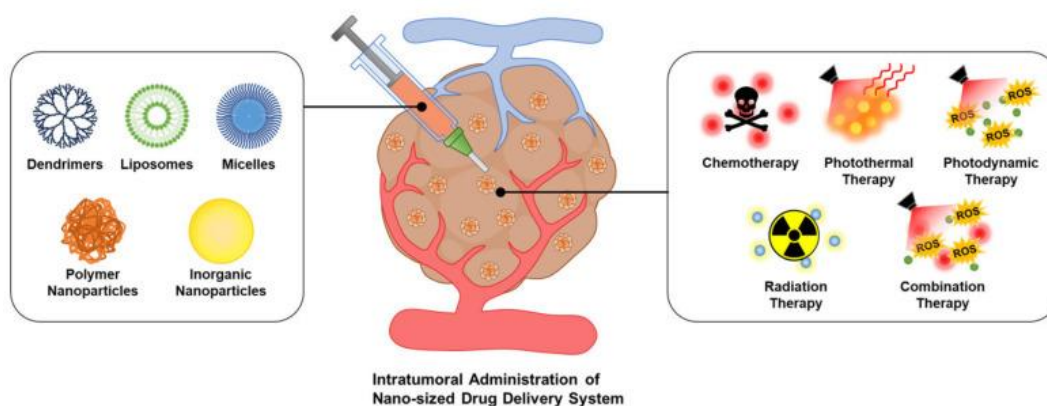


**Figura 1. Representación esquemática de la estructura de una nanopartícula híbrida lipídico-polimérica.** Se observa el núcleo polimérico con el principio activo envuelto por la cubierta lipídica cuya superficie se puede decorar de múltiples maneras para la orientación activa de las NPHLPs. Obtenida de Mukherjee et al., 2019 (2).

La terapia génica consiste en la administración de oligonucleótidos de ADN o ARN para la modulación de la expresión génica que se encuentra alterada o desregulada en un gran número de enfermedades (8,11). Este tipo de terapia ha mejorado tras el desarrollo de nuevos tipos de ácidos nucleicos sintéticos, como los oligonucleótidos antisentido monocatenarios (ASO), en concreto los “Gapmers”. Los Gapmers consisten en una región central de nucleótidos de ADN capaz de resistir la actividad de la RNasa H, flanqueada por regiones de ARN modificadas químicamente que promueven la unión a su objetivo y degradación del mismo (8,9).

La administración de oligonucleótidos por vía sistémica supone un problema porque, para que alcancen de forma efectiva su lugar de acción y sean captados intracelularmente, deben resistir tanto la degradación por parte de nucleasas como el aclaramiento renal y la eliminación por el sistema inmunitario (8,9). El uso de las NPHLPs en la terapia génica ofrece una posible solución, ya que actúan como sistemas de administración seguros y eficaces siendo capaces de determinar la distribución tisular de los oligonucleótidos, protegerlos de la degradación y facilitar su internalización celular en los sitios de acción (8,11). Como consecuencia, los avances de las NPHLPs en la terapia génica han mostrado enormes posibilidades de tratamiento para diversos trastornos genéticos hereditarios, enfermedades crónicas y tumores benignos, pero sobre todo malignos (5,10).

Al igual que la administración de los oligonucleótidos, la administración de NPHLPs por vía sistémica tampoco es la mejor opción, debido a que interactúan con los componentes sanguíneos pudiendo ser eliminadas del organismo antes de llegar a su sitio de acción. Por tanto, lo ideal es la administración local como podría ser la administración intratumoral, ya que implica una mayor acumulación en el tumor, por tanto, mejores resultados terapéuticos y reducen de los efectos tóxicos sistémicos. Como modelo de tumor se propone el mioma uterino, por ser un tumor localizado y limitado en el útero (13,14). El tratamiento farmacológico disponible para el mioma uterino se basa en un tratamiento hormonal que provoca importantes efectos secundarios, por ello el abordaje quirúrgico es la solución más frecuente, pero conlleva un coste sanitario importante, así como incomodidad y pérdida o disminución de la fertilidad para las pacientes. Por consiguiente, el desarrollo de una nueva estrategia de tratamiento no quirúrgico y localizado beneficiaría a un gran número de mujeres, pudiendo ser la terapia intratumoral una alternativa viable para mejorar su calidad de vida (14,15,16).



**Figura 2. Representación esquemática de la administración intratumoral de nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas.** Se pueden administrar distintos tipos de NPs por vía intratumoral para diferentes opciones terapéuticas. Obtenida de Su Yun et al., 2023 (13).

Para conseguir que la administración intratumoral de NPHLPs sea más efectiva, la superficie de las NPs se puede modificar con ligandos como péptidos, anticuerpos monoclonales, aptámeros y moléculas pequeñas, consiguiendo así orientar las NPs hacia las células diana y mejorar la eficiencia del tratamiento. La unión de los ligandos a la superficie de las NPs se puede realizar por adsorción física, a través de interacciones débiles no covalentes, o por conjugación química, mediante la formación de enlaces covalentes (17,18). Como ligando nos centraremos en el anti-CD24, un anticuerpo contra la glicoproteína de membrana CD24 que está sobreexpresada en un gran número de cánceres (5,12)



## **5. 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 de investigación financiado (PID2021-127493OB-C21).

El objetivo general del trabajo es elaborar nanopartículas híbridas lípido-poliméricas por el método de la nanoprecipitación optimizando sus características para una administración local de Gapmers.

Más detalladamente, los objetivos son:

1. Estudiar el efecto de la mezcla de lípidos usada en la fase acuosa externa, así como de la relación de fases orgánica/acuosa y ratio lípido/polímero sobre las características fisicoquímicas y estabilidad de las nanopartículas elaboradas.
2. Estudiar el efecto de la adición de albúmina en la fase acuosa externa y evaluación de su función como surfactante.
3. Evaluar la encapsulación del Gapmer condensado con protamina en las nanopartículas.
4. Funcionalizar de las nanopartículas con anti-CD24.
5. Estudiar la internalización celular de las nanopartículas.

## **6. Material y métodos**

### **6.1. Materiales**

Las NPHLPs se elaboran utilizando los siguientes reactivos y disolventes: ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) 50:50 (Resomer<sup>®</sup> RG 502, peso molecular (PM): 7000-17000 g/mol) (Boehringer Ingelheim, Alemania); sulfato de protamina (PM: 5000 g/mol), albúmina sérica bovina (PM: 66400 g/mol) y cumarina (PM: 146 g/mol) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos); clorhidrato de 3 $\beta$ -[N-(Dimetilaminoetano)carbamoil] colesterol (colesterol-DC) (PM: 537,3 g/mol) y L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (lecitina o fosfatidilcolina de soja) (PM: 775 g/mol) (Avanti Polar Lipids, Estados Unidos); colesterol-(polietilenglicol-2000) (colesterol-PEG<sub>2000</sub>) (PM: 2386,7 g/mol) (BroadPharm, Estados Unidos); colesterol-[succinimidil(polietilenglicol)-2000] (colesterol-PEG<sub>2000</sub>-NHS) (PM: 2501,8 g/mol) y 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[succinimidil(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-NHS) (PM: 2923,8 g/mol) (Nanosoft Polymers, Estados Unidos); Gapmer control (5'-56/FAM/AAC ACG TCT ATA CGC-3') (PM: 5456,5 g/mol) (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos); anti-CD24-Alexa Fluor 594 (PM: 35000-45000 g/mol) (Santa Cruz biotechnology, Estados Unidos); suero bovino fetal (FBS) y tampón fosfato salino (PBS) (Corning, Estados Unidos); éter polietilenglicol terc-octilfeni (Tryton X-100) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos); células mesenquimales primarias (línea celular C3H10T1/2) y mioblastos (línea celular C2C12) murinas (ATCC, Estados Unidos); etanol absoluto (PanReac Química SA, España); acetonitrilo (Merck Millipore, Alemania) y agua Milli-Q<sup>®</sup>.

### **6.2. Elaboración de las nanopartículas**

Las NPs fueron elaboradas por el método de nanoprecipitación, que consiste en añadir una fase orgánica conteniendo el polímero y donde está incorporado el Gapmer, a una disolución acuosa de lípidos bajo agitación magnética.

Los pasos para desarrollar este método son los siguientes:

1. Condensación del Gapmer con protamina. Se prepara una disolución conteniendo 1  $\mu$ g de Gapmer y 2,5  $\mu$ g de protamina en 30  $\mu$ l de agua libre de ARNasa y se incuba durante 40 minutos a temperatura ambiente, para que la protamina (péptido catiónico) por interacción iónica, condense el Gapmer facilitando así su posterior incorporación en la NPs.
2. Preparación de la fase orgánica. Se disuelven 2,5 mg de PLGA en 1 ml de acetonitrilo.
3. Preparación de la fase acuosa externa. Esta fase está formada por los lípidos y demás componentes de la cubierta de las NPs disueltos en una solución acuosa

de etanol al 4% (v/v). Las mezclas de componentes de la cubierta evaluadas fueron las siguientes:

- i. Lecitina y colesterol-DC con y sin albúmina:** las disoluciones de lecitina y colesterol-DC se preparan por separado y se mezclan a temperatura ambiente en el momento de su uso. La disolución de lecitina se prepara a 65°C en un vaso de precipitado tapado para evitar la evaporación del etanol bajo agitación magnética. Para la formulación conteniendo albúmina (0,5%), ésta se añade al final y se disuelve mediante agitación en vórtex. Estas mezclas se usaron manteniendo un ratio lípido/polímero del 25% (w/w) y variando la relación de fases orgánica/acuosa al modificar el volumen de la fase externa acuosa y, por tanto, la concentración de lípidos en dicha fase. En la *Tabla 1* se detalla la composición usada en las distintas formulaciones con estos componentes.
  - ii. Colesterol-DC y colesterol-PEG:** en este caso las disoluciones de cada lípido se preparan por separado y se mezclan en el momento de su uso. Con esta mezcla de lípidos se fijó la relación de fases orgánica/acuosa en 1:5 y se evaluaron diferentes ratios lípido/polímero y distintas proporciones de colesterol-PEG<sub>2000</sub>. En la *Tabla 2* se detalla la composición usada en distintas formulaciones con estos componentes.
- 4. Elaboración de las NPHLPs.** Se incorporan 25 µl de la disolución acuosa de Gapmer-protamina (833 ng de Gapmer) en la solución de PLGA y se agita en vórtex. Luego, esta fase orgánica se vierte sobre la fase acuosa externa bajo agitación magnética en campana de extracción y se deja durante 2 horas para completar la evaporación del acetonitrilo y la formación de las NPHLPs. Finalmente, las NPs se separan por filtración (filtros Amicon Ultra-15, 100 kDa, Merk Millipore, Alemania) en centrífuga (5 minutos, 8.000 rpm, temperatura ambiente) y se resuspenden en un volumen final de 400 µl.

Ratio lípido/polímero 25% (w/w)					
Formulación	Relación de fases (o/w)	Fase acuosa externa			
		Volumen etanol 4% (ml)	Lecitina (mg)	Colesterol-DC (mg)	Albúmina (mg)
1	1:5	5	0,3	0,33	--
2	1:10	10	0,3	0,33	--
3	1:20	20	0,3	0,33	--
4	1:5	5	0,3	0,33	25

**Tabla 1. Composición de la fase acuosa externa y relación de fases (orgánica/acuosa, v/v) de las formulaciones elaboradas con lecitina y colesterol-DC, con y sin albúmina y manteniendo el ratio lípido/polímero en 25% (w/w). Composición de la fase orgánica: 2,5 mg de PLGA en 1 mL de acetonitrilo.**

Relación de fases (o/w) 1:5				
Formulación	Ratio lípido/polímero (% w/w)	Colesterol-PEG <sub>2000</sub> (% molar)	Fase acuosa externa	
			Colesterol-PEG <sub>2000</sub> (mg)	Colesterol -DC (mg)
5	25	10	0,21	0,41
6	15	10	0,12	0,26
7	25	15	0,29	0,34
8	15	15	0,17	0,2
9	25	25	0,38	0,24
10	15	25	0,23	0,15

**Tabla 2. Composición de la fase acuosa externa, ratio lípido/polímero y proporción de PEG de las formulaciones elaboradas con colesterol-DC y colesterol-PEG<sub>2000</sub>, manteniendo una relación de fases orgánica/acuosa 1:5. Composición de la fase orgánica: 2,5 mg de PLGA en 1 mL de acetonitrilo.**

### **6.3. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas**

Las NPHLPs se caracterizaron en términos de tamaño medio de partícula, índice de polidispersión (pdl) y carga superficial (potencial zeta, PZ). Para ello, se usó el equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), el cual utiliza la técnica de dispersión dinámica de la luz para determinar el tamaño medio e índice de polidispersión, y la técnica de dispersión electroforética de luz para determinar el PZ.

Las NPs se caracterizaron antes y después de concentrarse, haciendo una dilución 1:10 y 1:100 con agua Milli-Q®, respectivamente.

### **6.4. Ensayo de estabilidad de las nanopartículas**

Se estudió la estabilidad de las nanopartículas incubándolas durante 2, 16 y 24 horas en PBS pH 7,4, a 4°C, así como en PBS pH 7,4, conteniendo FBS al 2% y al 10%, a 37°C, para simular las condiciones del cultivo celular. Se añaden 100 µl de cada lote de NPs (resuspendidas en un volumen final de 400 µl) a 900 µl de cada medio y se procede a su incubación. A los tiempos preestablecidos se determinan sus características fisicoquímicas como se describe en el apartado 6.3.

### **6.5. Ensayo de encapsulación y liberación del Gapmer**

Para este ensayo, las NPs son elaboradas con el Gapmer marcado fluorescentemente. Para determinar el rendimiento de encapsulación, tras centrifugar las NPs, el Gapmer no encapsulado se cuantificó en el subnadante midiendo la fluorescencia en un lector de microplacas (Biotek, Estados Unidos) a una longitud de onda de excitación y emisión de 485/20 y 528/20 nm, respectivamente. La concentración de Gapmer no encapsulado se determinó mediante la recta de calibrado elaborada con concentraciones de Gapmer en un intervalo de 12-413 ng/ml cuyo diluyente fue el subnadante de NPs blancas (sin Gapmer). El subnadante de NPs blancas también es utilizado para restar la fluorescencia de fondo en las muestras a determinar. El rendimiento de encapsulación se obtiene, por diferencia, a partir de la cantidad de Gapmer no encapsulado en relación a la cantidad de Gapmer añadido.

Se determinó la liberación del Gapmer desde las NPs al cabo de 24 horas de almacenamiento a 4°C. El lote de NPs se resuspende en un volumen final de 400 µl con PBS y se repite el mismo procedimiento para medir en el subnadante por fluorescencia el Gapmer liberado.

## **6.6. Funcionalización de las nanopartículas con anti-CD24**

Las NPHLPs se funcionalizaron utilizando dos estrategias diferentes, adsorción física que se realiza incubando las NPs con el anti-CD24 y conjugación química, donde en la elaboración de las NPs es necesario sustituir un 5% del colesterol-PEG<sub>2000</sub> por colesterol-PEG<sub>2000</sub>-NHS o un 5% de lecitina por DSPE-PEG<sub>2000</sub>-NHS, según los lípidos de la formulación de NPs a funcionalizar, cuyo objetivo es promover la reacción entre los grupos NHS presentes en la superficie de las NPHLPs con los grupos amino de los anticuerpos, dando lugar a un enlace covalente. En ambos casos, las NPs concentradas se resuspenden en 383  $\mu$ l de agua Milli-Q®, ajustando el pH a 7,4 con 100  $\mu$ l PBS 5X, pH óptimo para que tenga lugar la reacción covalente. Posteriormente, las dispersiones de NPs se incubaron con 17  $\mu$ l de la solución anti-CD24 marcado fluorescentemente (5 mg/ml) a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se determina la eficiencia de asociación (EA). Para ello, las NPs se centrifugaron para separar la fracción de anticuerpo no incorporada en el subnadrante y midiendo la fluorescencia en un lector de microplacas a una longitud de onda de excitación y emisión de 590/20 y 645/40 nm. Las nanopartículas se resuspenden nuevamente en un volumen final de 500  $\mu$ l con agua Milli-Q® conservándolas a 4°C para repetir el mismo procedimiento a las 24 horas y evaluar la estabilidad de asociación.

## **6.7. Ensayo de internalización de nanopartículas en células**

Se cultivan las células mesenquimales (C3H10T1/2) y mioblastos (C2C12) hasta una confluencia del 80% en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco's (DMEM) suplementado y se siembran a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pocillo para C3H10T1/2 y  $5 \times 10^3$  células/pocillo para C2C12 en placas 96 pocillos, dejando adherirse durante 24 horas. A continuación, se sigue el siguiente protocolo:

1. Elaboración de las NPHLPs incorporando cumarina en la fase orgánica (10  $\mu$ l), sustancia fluorescente que permite analizar el porcentaje de internalización. Además, se preparan NPs blancas (no funcionalizadas) y funcionalizadas.
2. Retirar el medio de cultivo de las células y lavar dos veces con PBS.
3. Añadir las NPs (2 mg/ml) diluidas en medio de cultivo suplementado a los pocillos (5 pocillos por lote producido) y medir la fluorescencia inicial en un lector de microplacas a una longitud de onda de excitación y emisión de 485/528 nm.
4. Transcurridas 2 horas de incubación, se retiran las NPs y el medio de cultivo, se lavan las placas con PBS para eliminar aquellas NPs no internalizadas y luego se añade Tryton X-100 para lisar las células y poder medir la fluorescencia, determinando el porcentaje de internalización por diferencia.

## 7. Resultados y discusión

Todos los ensayos y lotes de nanopartículas están hechos por triplicado, por lo que los resultados corresponden al valor medio y su desviación estándar.

### 7.1. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

En la *Tabla 3*, están recogidos las características fisicoquímicas de las formulaciones elaboradas con lecitina y colesterol-DC, con y sin albúmina, y, en base a los resultados obtenidos, se procedió a caracterizar solamente la formulación 1 y 4 tras su concentración por centrifugación.

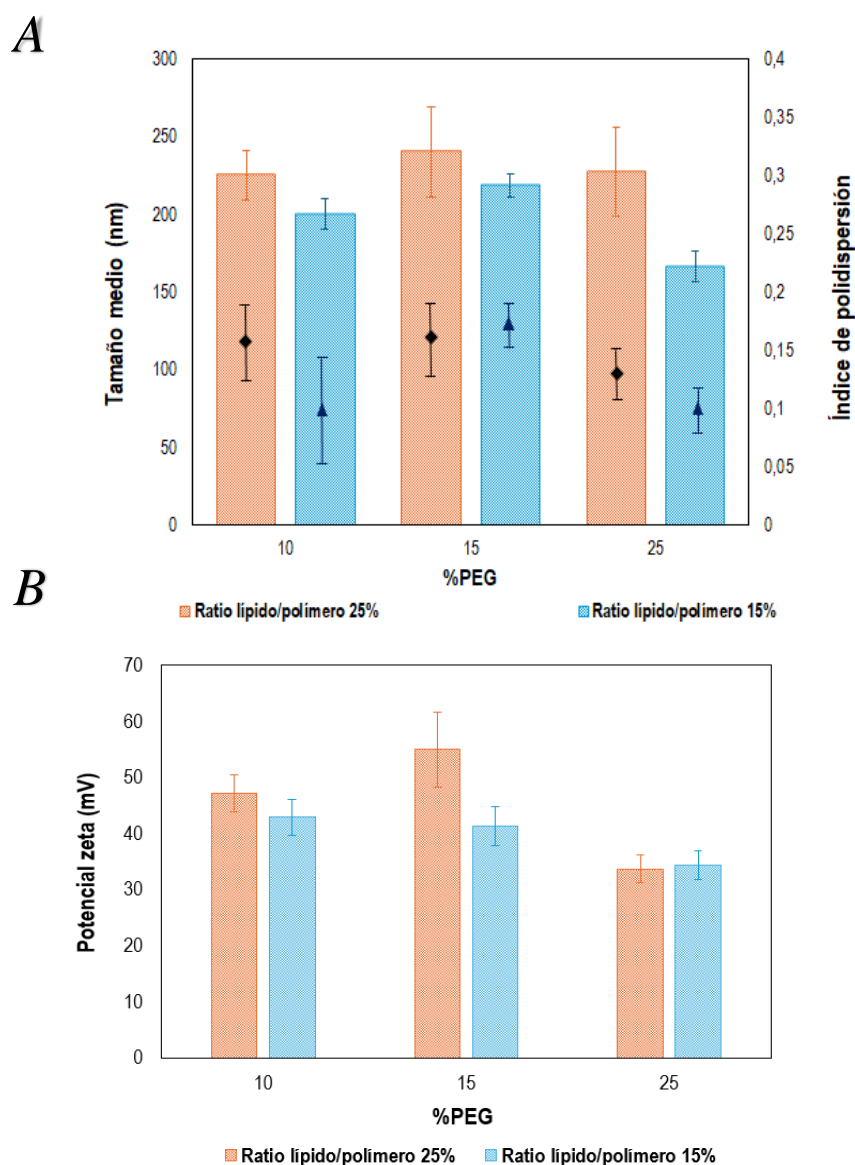
Formulación	Relación de fases (o/w)	Tamaño medio (nm)	Índice de polidispersión (pdl)	Potencial zeta (mV)
1	1:5	171,5±16,01	0,17±0,04	50±5,43
1 concentrada	1:5	251,02±32,78	0,3±0,074	37,21±15,83
2	1:10	270,83±3,94	0,28±0,01	40,6±2,62
3	1:20	227,18±5,1	0,23±0,01	53,54±7,12
4	1:5	111,81±9,47	0,3±0,038	-22,81±3,32
4 concentrada	1:5	110,2±6,83	0,22±0,02	-14,71±1,10

**Tabla 3. Tamaño medio, índice de polidispersión y potencial zeta de las nanopartículas elaboradas con lecitina y colesterol-DC, con albúmina (formulación 4) y sin albúmina y manteniendo el ratio lípido/polímero en 25% (w/w).**

En las NPs elaboradas con lecitina y colesterol-DC (*Tablas 1 y 3*, formulaciones 1-3) se observa que al aumentar la relación de fases orgánica/acuosa, y, por tanto, disminuir la concentración de lípidos, aumenta el tamaño y pdl. Sin embargo, el PZ no se ve modificado, manteniéndose en un valor positivo gracias a la presencia del lípido catiónico (colesterol-DC) en la superficie de las NPs. Por tanto, la formulación con menor tamaño y pdl es la elaborada con una relación de fases 1:5, por lo que se procedió a su centrifugación, observándose un notable aumento del tamaño y pdl, consecuencia de la agregación de las NPs por no incluir ningún surfactante en su composición.

Por ello, sobre esta formulación se probó la adición de albúmina como surfactante (*Tablas 1 y 3*, formulación 4). Con la incorporación de albúmina se obtienen NPs con un tamaño bastante pequeño, que, en este caso, se mantiene tras su purificación. No obstante, las NPs presentan un PZ negativo, acorde con el punto isoeléctrico (4,9) de la albúmina, lo cual puede limitar su internalización en las células.

La siguiente estrategia fue incorporar un lípido pegilado (colesterol-PEG<sub>2000</sub>) en la composición de las NPs, elaborando NPs con distintos ratios lípido/polímero y proporciones de colesterol-PEG<sub>2000</sub> (*Tabla 2*, formulaciones 5-10) para determinar el porcentaje mínimo de lípidos y proporción de PEGilación que permite obtener NPs con características óptimas. En la *Gráfica 1* se recogen los resultados de las características fisicoquímicas de las NPs elaboradas con PEG.





**Gráfica 1. Tamaño medio (barras) e índice de polidispersión (símbolos) (A) y potencial zeta (B) de las nanopartículas elaboradas con colesterol-DC y colesterol-PEG<sub>2000</sub>, manteniendo una relación de fases orgánica/acuosa 1:5.**

En general, se observa que al aumentar la proporción de PEG y con un ratio lípido/polímero del 15%, en lugar del 25%, la tendencia es obtener NPs con un menor tamaño y pdl. Aun así, en todos los casos el pdl es menor a 0,3 y PZ figura positivo (>35 mV). El mejor resultado se obtiene con un ratio lípido/polímero del 15% y 25% de PEG (formulación 10), por lo que se procedió al aislamiento de las NPs por centrifugación, resultados mostrados en la *Tabla 4*.

Formulación	Tamaño medio (nm)	Índice de polidispersión (pdl)	Potencial zeta (mV)
<b>10</b>	166,02±8,4	0,11±0,079	34,44±2,54
<b>10 concentrada</b>	<b>167,39±4,13</b>	<b>0,14±0,015</b>	<b>26,63±6,60</b>

**Tabla 4. Tamaño medio, índice de polidispersión y potencial zeta de la formulación elaborada con colesterol-DC y colesterol-PEG<sub>2000</sub> (25%) y ratio lípido/polímero 15%, antes y después de separar por centrifugación. Relación de fases orgánica/acuosa 1:5.**

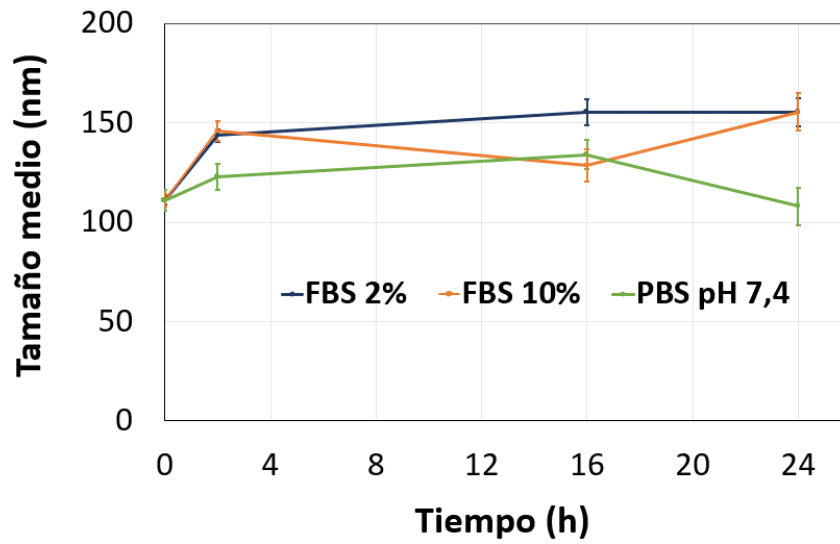
Como se observa en la *Tabla 4*, la incorporación de PEG en un 25% permite separar y concentrar las NPs sin modificaciones en sus características fisicoquímicas.

Finalmente, de todas las formulaciones se eligieron 2 para los posteriores ensayos. La formulación con lecitina, colesterol-DC y albúmina con un ratio lípido/polímero del 25% (w/w) y relación de fases 1:5 (formulación 4) y la formulación con colesterol-DC y colesterol-PEG<sub>2000</sub> con un ratio lípido/polímero del 15%, 25% de PEG y relación de fases 1:5 (formulación 10).

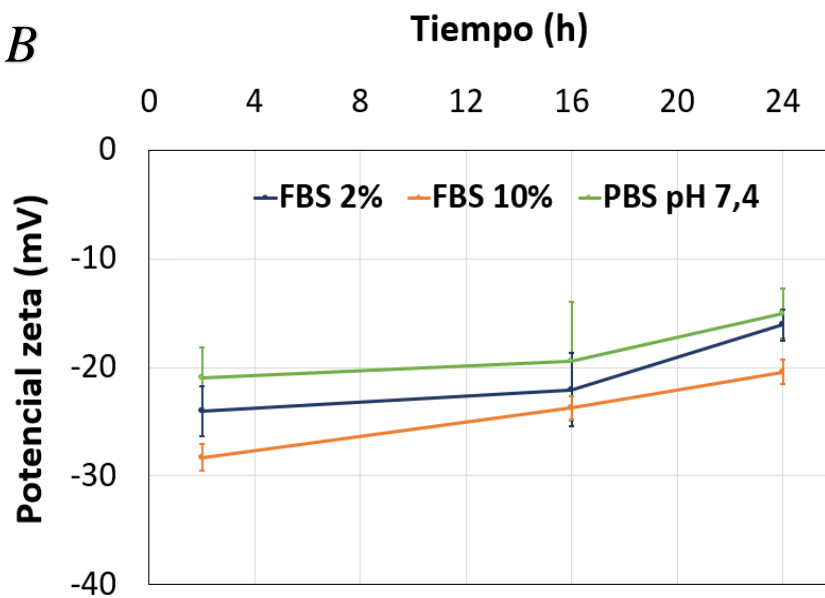
## **7.2. Estabilidad de las nanopartículas**

En las *Gráficas 2 y 3* se muestra la evolución de las características fisicoquímicas de las formulaciones 4 y 10, respectivamente.

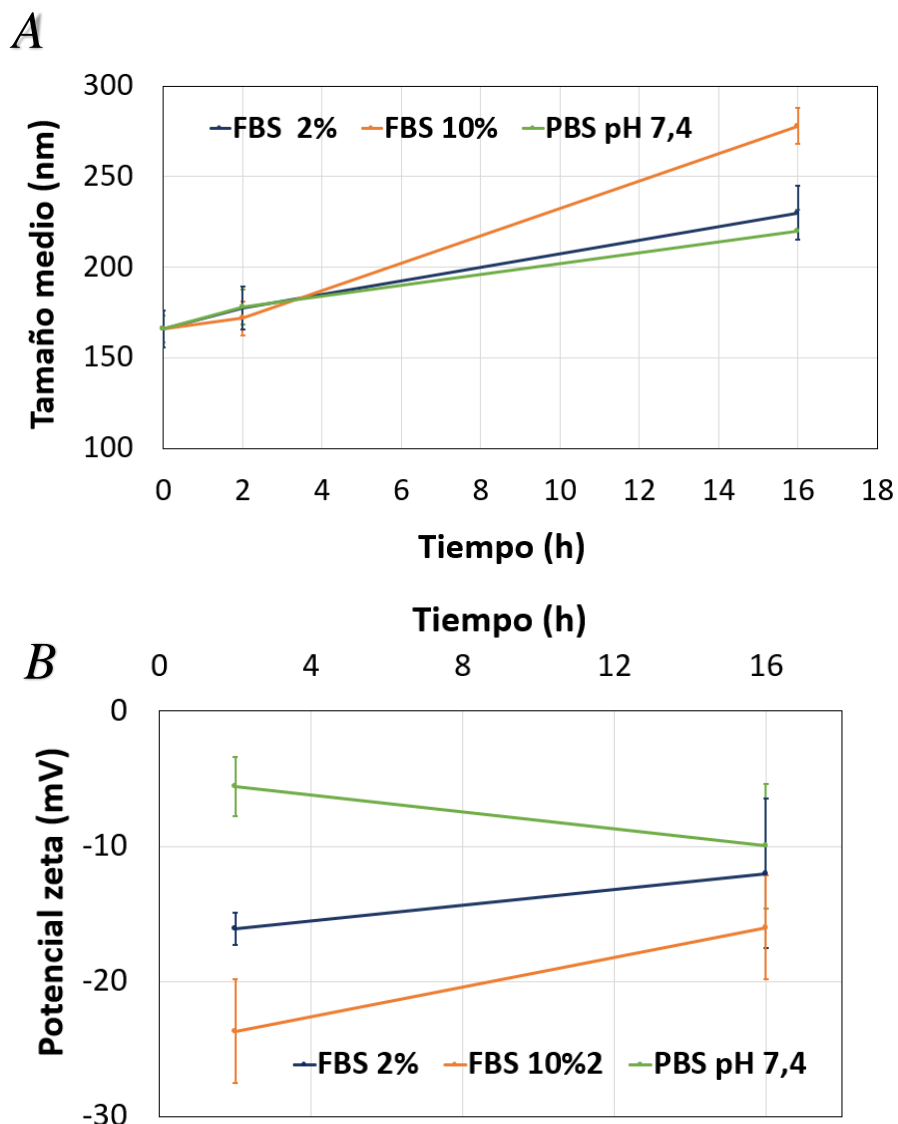
**A**



**B**



**Gráfica 2. Estabilidad de la formulación 4. Evolución del tamaño medio (A) y potencial zeta (B) durante su incubación en PBS pH 7,4 a 4°C y en este medio conteniendo un 2% o un 10% de FBS a 37°C.**



**Gráfica 3. Estabilidad de la formulación 10. Evolución del tamaño medio (A) y potencial zeta (B) durante su incubación en PBS pH 7,4 a 4°C y en este medio conteniendo un 2% o un 10% de FBS a 37°C.**

Se observa que la formulación 4 es estable hasta las 24 horas en cualquiera de las tres condiciones evaluadas. No obstante, la formulación 10 pierde la estabilidad, sobre todo en FBS al 10%, aumentando significativamente de tamaño a las 16 horas, decidiendo finalizar el ensayo a ese tiempo. Este aumento de tamaño puede ser debido tanto al incremento de la fuerza iónica del medio, que neutraliza la carga superficial de las nanopartículas y hace que disminuya las fuerzas de repulsión entre ellas, como a la adsorción de las proteínas del medio dando lugar a la agregación de las nanopartículas.

### 7.3. Evaluación de la eficiencia de encapsulación y liberación del Gapmer

Como el ensayo se realizó con dos formulaciones de NPs distintas, se elaboraron dos rectas de calibrado, ya que la composición de la fase acuosa externa cambia.

Las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas fueron las siguientes, donde la  $y$  representa la fluorescencia y la  $x$  la concentración de Gapmer en ng/ml.

- Formulación 4  $\rightarrow y = 11,686x \quad r^2 = 0,995$
- Formulación 10  $\rightarrow y = 11,58x \quad r^2 = 0,942$

En ambas rectas se obtiene un coeficiente de correlación,  $r^2$ , próximo a la unidad, por lo que, el modelo lineal es adecuado.

Con cualquiera de las formulaciones seleccionadas, se obtiene una eficiencia de encapsulación alta (> 95%), sin embargo, con la formulación conteniendo albúmina se libera un mayor porcentaje (80%) del Gapmer encapsulado, en comparación con la que contiene PEG (50%), lo que limita el tiempo de uso de la primera de ellas (*Tabla 5*).

Formulación	Eficiencia de encapsulación (%EE)	%Gapmer liberado a las 24 h
4	95,27%±3,34	80%±2,43
10	95%±2,63	50,5%±2,4

**Tabla 5. Resultados del ensayo de encapsulación y liberación del Gapmer.**

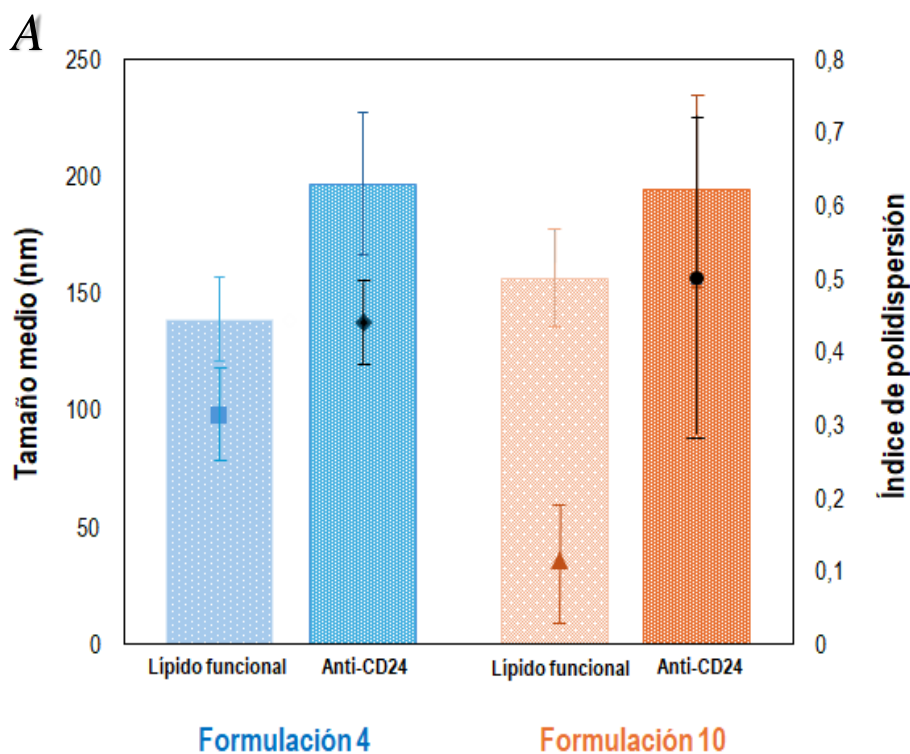
### 7.4. Evaluación de la eficiencia de la funcionalización con anti-CD24

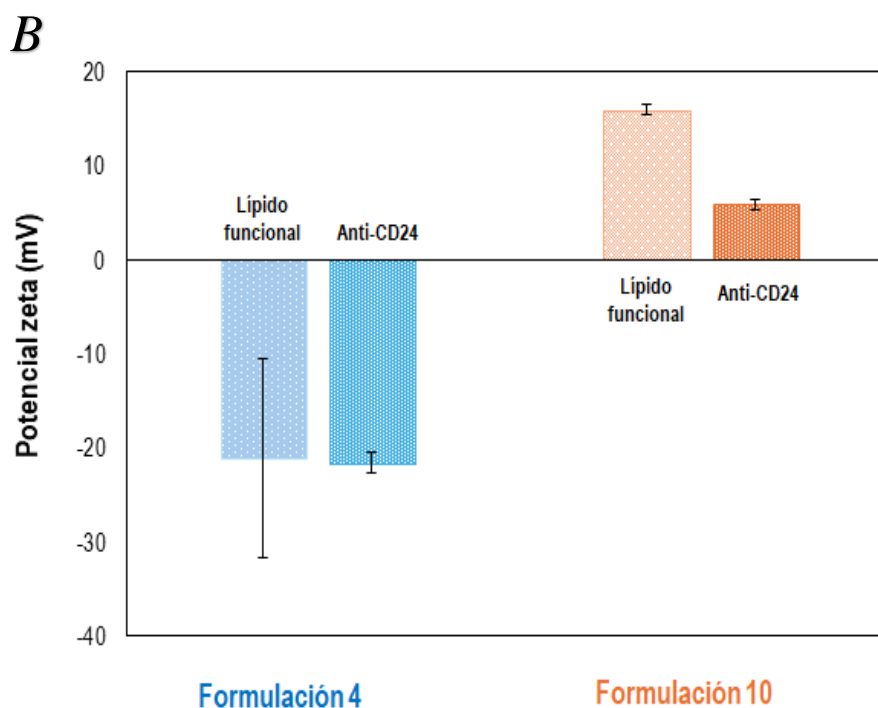
Los porcentajes de funcionalización obtenidos en las formulaciones seleccionadas (*Tabla 6*) son igual de buenos por adsorción que por conjugación química ( $t = 0$  h). No obstante, hay que señalar que la funcionalización por conjugación química es más reproducible y, sobre todo, más estable en el tiempo ( $t = 24$  h).

Formulación	Tipo de funcionalización	t = 0 h	t = 24 h
4	Adsorción física	86,5%±2,47	66,73%±4,3
	Conjugación química	87,88%±0,1	<b>85%±0,2</b>
10	Adsorción física	92%±2,83	76,13%±4,03
	Conjugación química	93,3%±0,8	<b>91,55%±0,5</b>

**Tabla 6.** Porcentajes obtenidos del ensayo de funcionalización con anti-CD24 por adsorción física y conjugación química, recién funcionalizados ( $t = 0$  h) y tras 24 horas de la funcionalización.

En la Gráfica 4 se muestran las características fisicoquímicas de las formulaciones seleccionadas antes y después de funcionalizar, la funcionalización incrementa el tamaño de nanopartícula y pdl, mientras que el PZ se mantiene en el caso de las NPs con albúmina, y se hace menos positivo en el caso de las NPs con PEG.





**Gráfica 4. Tamaño medio e índice de polidispersión (A) y potencial zeta (B) de las nanopartículas con lípidos con grupo funcional y funcionalizadas.**

### 7.5. Evaluación de la internalización de nanopartículas en células

Teniendo en cuenta los resultados del ensayo de funcionalización, en el ensayo de internalización se usan las NPs funcionalizadas únicamente por conjugación química.

Formulación	Tipo de LPHNPs	Tipo de células	% internalización
4	Blancas	C2C12	8,6±0,9
		C3H10T1/2	7,7±1,4
	Funcionalizadas	C2C12	7,6±0,95
		C3H10T1/2	6,4±0,08
10	Blancas	C2C12	6,41±0,57
		C3H10T1/2	6,03±0,7
	Funcionalizadas	C2C12	6,4±0,41
		C3H10T1/2	6,3±1,01

**Tabla 7. Resultados obtenidos del ensayo de internalización con nanopartículas blancas (no funcionalizadas) y funcionalizadas por conjugación química para ambas formulaciones (formulación 4 con albúmina y formulación 10 con PEG).**

Como se observa en la *Tabla 7*, los resultados de internalización obtenidos son similares con ambas formulaciones y líneas celulares, no observándose diferencias entre las NPs blancas y funcionalizadas. Cabe decir que la funcionalización incrementa el tamaño de las nanopartículas y podría disminuir la eficiencia de internalización, aunque los tamaños finales no superan los 200 nm en ninguno de los casos. Entre las NPs sin funcionalizar, tampoco se observan diferencias en la internalización de NPs conteniendo albúmina (formulación 4, PZ negativo) y las que contienen PEG (formulación 10, PZ positivo) a pesar de que inicialmente presentan una carga superficial diferente, aunque las primeras presentan un tamaño de nanopartícula significativamente menor.

## **8. Conclusiones**

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

1. La composición de la cubierta lipídica afecta a las características de las NPs y es necesario incorporar un surfactante en su superficie para evitar que se agreguen al separarlas del medio.
2. Las nanopartículas con un tamaño óptimo se obtienen con una relación de fases 1:5, incluyendo albúmina en la fase acuosa externa o bien con ratio lípido/polímero del 15% e incorporando un 25% de lípido-PEGilado.
3. El tipo de surfactante empleado no influye en la eficiencia de encapsulación del Gapmer. Además, la incorporación del Gapmer no afecta a las características de las NPs.
4. La funcionalización por conjugación química es más reproducible y, sobre todo, más estable en el tiempo que la funcionalización por adsorción física.
5. La funcionalización con anti-CD24 aumenta el tamaño de las nanopartículas.
6. No se han observado diferencias entre la internalización de nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar.



## 9. Bibliografía

1. Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *Int J Nanomedicine*, 2007; 2(2):129-141.
2. 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. doi: 10.2147/IJN.S198353
3. Ferreira Soares DC, Domingues SC, Viana DB, Tebaldi ML. Polymer-hybrid nanoparticles: Current advances in biomedical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020; 131:110695. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110695
4. Rouco H, García-García P, Évora C, Díaz-Rodríguez P, Delgado A. Screening strategies for surface modification of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2022; 624:121973. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121973
5. Dave V, Tak K, Sohgaora A, Gupta A, Sadhu V, Reddy KR. Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Synthesis strategies and biomedical applications. *Journal of Microbiological Methods*, 2019; 160:130-142. doi: 10.1016/j.mimet.2019.03.017
6. Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA, et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017; 532(1):66-81. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.064
7. Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2020;19(10):673-694. doi: 10.1038/s41573-020-0075-7
8. Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 2016; 44(14):6518-6548. doi: 10.1093/nar/gkw236
9. Arjmand B, Larijani B, Sheikh Hosseini M, Payab M, Gilany K, Goodarzi P, et al. The horizon of gene therapy in modern medicine: advances and challenges. En: Turksen K, editor. *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 8: Stem Cells in Regenerative Medicine*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 33-64.
10. Del Pozo-Rodríguez A, Rodríguez-Gascón A, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, Gómez-Aguado I, Battaglia LS, et al. Gene therapy. En: Silva AC, Moreira JN, Lobo JMS, Almeida H, editores. *Current Applications of Pharmaceutical Biotechnology*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 321-368.
11. Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, 2010; 62(2):90-109. doi: 10.1016/j.phrs.2010.03.005
12. Yun WS, Kim J, Lim DK, Kim DH, Jeon SI, Kim K. Recent studies and progress in the intratumoral administration of nano-sized drug delivery systems. *Nanomaterials (Basel)*, 2023; 13(15):2225. doi: 10.3390/nano13152225
13. Al-Hendy A, Salama S. Gene therapy and uterine leiomyoma: a review. *Hum Reprod Update*, 2006; 12(4):385-400. doi: 10.1093/humupd/dml015

14. Huerga López C, Gutiérrez Alagüero A, Cristóbal García I. Abordaje de los miomas uterinos: aproximación al tratamiento médico. *Medicina Clínica*, 2023; 161:S15-21. doi: 10.1016/j.medcli.2023.06.035
15. Salas A, García-García P, Díaz-Rodríguez P, Évora C, Almeida TA, Delgado A. New local ganirelix sustained release therapy for uterine leiomyoma. Evaluation in a preclinical organ model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022; 156:113909. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113909
16. Marques AC, Costa PJ, Velho S, Amaral MH. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies. *Journal of Controlled Release*, 2020; 320:180-200. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.01.035
17. Drosch M, Schmidt N, Markowski DN, Zollner TM, Koch M, Bullerdiek J. The CD24hi smooth muscle subpopulation is the predominant fraction in uterine fibroids. *Mol Hum Reprod*, 2014; 20(7):664–676. doi: 10.1093/molehr/gau022