



**Universidad
de La Laguna**



Grado en Farmacia

Curso 2023-2024

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Desarrollo de Nanopartículas
dirigidas a tejido óseo**

Autor:

Josimar Godoy González

alu0101361222@ull.edu.es

Tutora:

Carmen María Évora García

Co-tutor:

Daniel González García

San Cristóbal de La Laguna, mayo de 2024

Facultad de Farmacia

Índice

Índice	2
Datos referidos a la memoria	3
Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
Hipótesis	12
Objetivos	13
Materiales y métodos	14
Materiales	14
Ensayo de complejación calcitonina-GapmeR	14
Elaboración de las NPHLPs	15
Caracterización de las NPHLPs elaboradas	16
1. Ensayo de encapsulación y liberación del GapmeR	16
2. Caracterización fisicoquímica de las NPs	16
3. Estabilidad de las NPHLPs	16
Funcionalización con aptámero	17
Ensayo de internalización	17
Resultados y discusión	18
Caracterización fisicoquímica de las NPHLPs	18
Evaluación de la estabilidad de las NPHLPs	19
Evaluación de la eficiencia de encapsulación y liberación del GapmeR	20
Evaluación de la funcionalización e internalización de las NPHLPs	21
Conclusiones	23
Bibliografía	24

Datos referidos a la memoria

Número de páginas de la memoria	27
Número de palabras totales de la memoria sin contar resumen, abstract, pie de tablas o figuras y referencias.	3465
Número de palabras del resumen	250
Número de palabras del abstract	222

Resumen

Las nanopartículas híbridas lípido-poliméricas se han asentado como un nuevo sistema de administración sistémica de fármacos. La estructura de estos nanotransportadores deriva tanto de las nanopartículas poliméricas como de los liposomas, aunando sus puntos fuertes, lo que permite una cesión más controlada del agente activo así como una mayor especificidad por el tejido diana.

En comparación con las técnicas de nanoprecipitación convencionales, su elaboración asistida por microfluídica garantiza la reproducibilidad lote a lote y permite obtener nanopartículas con un tamaño uniforme e índice de polidispersión bajo. Independientemente de la técnica, resulta imprescindible controlar una serie de factores como la relación lípido/polímero, la presencia de lípidos pegilados y la relación de flujos de ambas fases.

En este trabajo se llevará a cabo el estudio de la complejación calcitonina-GapmeR, siendo este el agente activo implicado en el silenciamiento del gen SFRP1, responsable del desequilibrio en el balance formación/resorción ósea. Seguidamente, se continuará con la producción de nanopartículas híbridas, su caracterización fisicoquímica, la funcionalización de la cubierta lipídica con aptámero y, por último, se evaluará la internalización celular.

Los resultados obtenidos respaldan el empleo de la microfluídica para la obtención de nanopartículas de menor tamaño e índice de polidispersión. Por otro lado, se observa que el empleo de lípidos pegilados proporciona estabilidad a las nanopartículas y la calcitonina permite la encapsulación del GapmeR, controlando su liberación. Por último, se establece que la funcionalización no modifica las características fisicoquímicas y que el aptámero empleado es poco específico para la línea celular ensayada.

Abstract

Hybrid lipid-polymeric nanoparticles have emerged as a novel system for systemic drug delivery. The structure of these nanocarriers derives from both polymeric nanoparticles and liposomes, combining their strengths, thus allowing for a more controlled release of the active agent as well as enhanced specificity for the target tissue.

Compared to conventional nanoprecipitation techniques, the microfluidics-assisted nanoprecipitation fabrication ensures batch-to-batch reproducibility and enables the production of nanoparticles with uniform size and low polydispersity index. Regardless of the technique, it is essential to control a series of factors such as the lipid/polymer ratio, the presence of PEGylated lipids, and the flow rate ratio of both phases.

This study will focus on the complexation of calcitonin with GapmeR, the active agent involved in silencing the SFRP1 gene, responsible for the imbalance in bone formation/resorption. Subsequently, the production of hybrid nanoparticles, their physicochemical characterization, lipid coating functionalization with aptamer, and cellular internalization evaluation will be conducted.

The results obtained support the use of microfluidics for obtaining nanoparticles with smaller size and lower polydispersity index. Additionally, it is observed that the use of PEGylated lipids provides stability to the nanoparticles, and calcitonin enables the encapsulation of GapmeR, controlling its release. Finally, it is established that functionalization does not modify the physicochemical characteristics and that the aptamer employed exhibits low specificity for the tested cell line.

Introducción

En las últimas décadas, la nanotecnología se ha asentado como una de las alternativas más prometedoras para la administración, por vía sistémica, de gran diversidad de moléculas como péptidos, ARN, antitumorales, etc¹. De forma general, las ventajas del empleo de nanopartículas (NPs) en la administración de un agente activo se resumen en las siguientes:

- 1) Mejora de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del fármaco sin afectar a su estructura molecular¹.
- 2) Aumento en la selectividad hacia un tejido o célula determinada^{1,2}.
- 3) Liberación controlada del fármaco en su sitio de acción.
- 4) Administración de múltiples fármacos con diferentes propiedades químicas^{2,3}.

Dentro de los distintos tipos de nanotransportadores aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) y la EMA (Agencia Europea del Medicamento), se diferencian, entre otros, los liposomas y las nanopartículas poliméricas^{4,5}. Los liposomas se definen como vesículas lipídicas formadas por una o varias capas¹, presentando una baja solubilidad, así como una vida media corta debido a problemas de estabilidad^{6,7}. Por otro lado, las nanopartículas poliméricas son los nanotransportadores mejor caracterizados, resultando de especial interés por su pequeño tamaño y liberación más controlada del fármaco, a pesar de exhibir limitaciones como la degradación del núcleo polimérico⁸.

Recientemente, como alternativa, surgen las nanopartículas híbridas lípido-poliméricas (NPHLPs), que reúnen los puntos fuertes de ambos sistemas, constituyendo así la nueva generación de nanoestructuras¹ (Figura 1). En lo que respecta a su estructura, se diferencia:

- 1) Un núcleo polimérico en el que se encuentra encapsulado el principio activo^{9,10}.
- 2) Una monocapa lipídica que rodea el núcleo polimérico, que actúa como barrera limitando la pérdida de la molécula activa y protegiendo al núcleo frente a la degradación al impedir la difusión de agua hacia el interior de la NP¹¹.
- 3) Una capa externa de lípidos pegilados que confiere estabilidad estérica a la NP y prolonga su circulación sistémica al evadir el sistema inmune^{9,10}. Además, se

pueden asociar anticuerpos o aptámeros con el fin de aumentar la afinidad de las NPs por el tejido o célula diana¹.

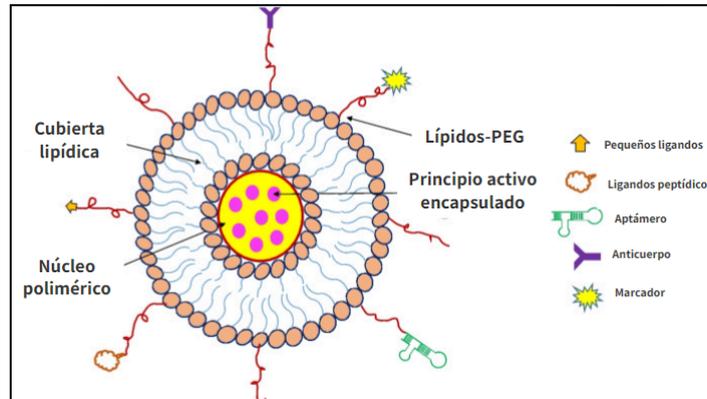


Figura 1. Estructura general de una nanopartícula híbrida lípido-polimérica. En esta figura se señalan las tres capas de las NPHLPs: un núcleo polimérico donde se encuentra encapsulado el agente activo; una cubierta lipídica que rodea dicho núcleo, evitando su degradación; una capa externa formada por lípidos pegilados a los que se pueden unir anticuerpos, aptámeros, entre otras moléculas. *Figura adaptada de Gajbhiye et al., 2023 (35).*

Las NPHLPs pueden elaborarse por varios métodos: en dos pasos y en un solo paso. En este trabajo se han preparado por nanoprecipitación, asistida por microfluídica, en un solo paso.

La nanoprecipitación se basa en añadir una disolución del polímero, que constituye la fase orgánica (fo), sobre una dispersión acuosa/etanólica de lípidos (fase acuosa (fw)), lo que genera la precipitación del polímero y el posterior autoensamblaje de los lípidos a su alrededor.

La microfluídica es una técnica que permite controlar con precisión el flujo de fluidos de pequeños volúmenes (dirigiendo, mezclando y separando los flujos) a través de redes de microcanales de diferentes tamaños y geometría¹¹, con el objetivo de obtener NPs de tamaño uniforme y un índice de polidispersión (PDI) bajo⁴. Además, no requieren grandes espacios industriales y favorece la reproducibilidad lote a lote⁴.

En la Figura 2 se reflejan los componentes de los sistemas de microfluídica y la clasificación de los micromezcladores, en función del flujo en el canal de mezclado principal, se resumen en la Tabla 1.

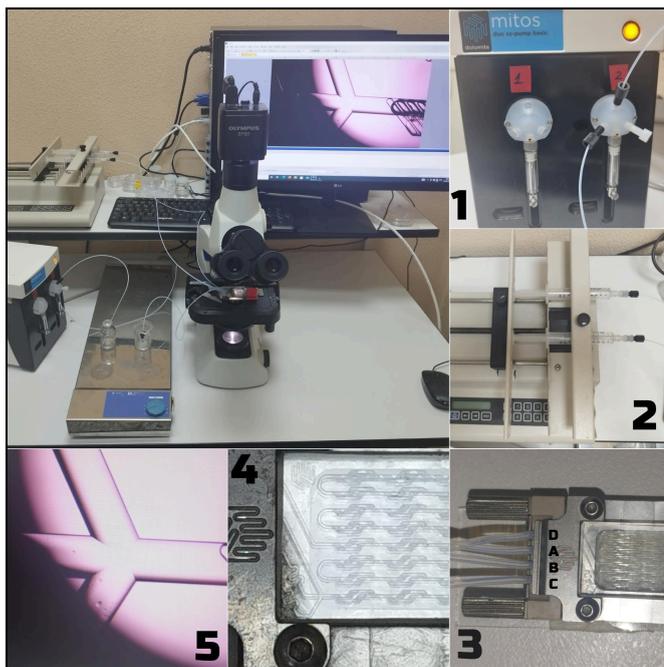


Figura 2. Estructura general de un sistema de microfluidica. (1) Dolomite Mito Pump, se trata de una bomba con una doble función: por un lado se encarga de recoger la fo en la que está disuelto el polímero y, a continuación, la eyecta a una velocidad constante hacia el micromezclador; (2) bomba de jeringas encargada de eyectar la dispersión acuosa de lípidos, presentando en este caso dos salidas dado que el micromezclador presenta tres entradas; (3) se trata del micromezclador, donde tiene lugar la formación de las NPs. Como se señala en la figura, las entradas A y C es por donde tiene lugar el paso de la dispersión de lípidos, mientras que la entrada B se emplea para la fo. Por último, la salida de las NPs ocurre por la zona D; (4) ofrece una imagen ampliada del micromezclador, donde se aprecia el circuito interior; (5) visualización mediante microscopía del canal de mezclado principal, siendo este el punto de encuentro de ambas fases. *Figura de elaboración propia.*

Tipo de micromezclador	Características	Ventajas	Desventajas
De flujo continuo (monofásico) ¹³	-Combinación de fluidos por difusión en condiciones de flujo laminar ¹¹ -Se rige por el número de Reynolds, inferior a 100 ^{14,15}	-Permite corrientes de flujo laminar ¹¹	-Mezclado lento ¹¹ -Obstrucción de los canales ¹³
De flujo segmentado (multifásico) ¹³	-Formación espontánea de gotas debido al empleo de dos fases inmiscibles ¹¹	-Mezclado rápido ¹¹	-Obstrucción de los canales ¹³

Tabla 1. Clasificación de los micromezcladores en relación a la naturaleza del flujo en el canal de mezclado principal, además de sus características, ventajas y desventajas.

A su vez, dentro de los micromezcladores de flujo continuo, se pueden diferenciar dos tipos, como se señala en la Tabla 2.

Tipo de micromezclador	Ventajas	Desventajas
De flujo continuo pasivo ¹³	-No requieren una fuente externa de energía ¹¹	-No son adaptables o controlables ¹³
De flujo continuo activo ¹³	-Adaptables ¹³	-Más caros -Incompatibles con determinados componentes biológicos debido a la aplicación de presión, sonido o temperatura ¹⁶

Tabla 2. Clasificación de los micromezcladores de flujo continuo y sus respectivas ventajas y desventajas.

En este caso, para la elaboración de las NPHLPs conteniendo oligonucleótidos, se ha empleado un micromezclador de flujo continuo pasivo.

La producción de NPs mediante el empleo de micromezcladores está caracterizada por una alta relación entre el área superficial y el flujo que circula por los canales, lo que genera una difusión más rápida de los disolventes, acortándose así el proceso de nucleación y dando lugar a NPs de menor tamaño y distribución uniforme^{11,17,18}. Además, en este proceso, la transferencia de calor y masa se produce rápidamente, la encapsulación del principio activo es muy alta y existe un mayor control de la liberación del mismo^{17,18}. En comparación, las técnicas convencionales de nanoprecipitación son más propensas a producir NPs de mayor tamaño, PDI y un menor rendimiento del proceso^{11,18}. No obstante, este método presenta una serie de limitaciones: obstrucción de los microcanales, lo que requiere una limpieza continua del sistema y se trata de un sistema exigente en términos de coste y tiempo^{19,20,21}.

Independientemente de las ventajas y desventajas, es importante tener en cuenta que existen una serie de factores que resultan imprescindibles controlar para optimizar el proceso¹:

- Relación lípido-polímero (L/P). Cuando $L/P > 25\%$, se alcanza la CMC (concentración micelar crítica) y se pueden formar liposomas, debido al exceso

de lípidos. Por el contrario, relaciones menores pueden producir recubrimientos incompletos que se asocian a procesos de agregación^{1,9}, reducción de la eficiencia de encapsulación (EE%) y liberación no controlada del agente activo^{9,22}.

- Presencia de lípidos-PEG, tamaño de la cadena y peso molecular, para asegurar la estabilidad de la formulación¹. Además, reducen la adsorción de proteínas plasmáticas, disminuyendo la captación por el sistema retículo-endotelial y, en consecuencia, prolonga la vida media y disminuye la inmunogenicidad^{23,24,25}.
- Relación de flujos¹¹. Es uno de los parámetros fundamentales a controlar y podemos diferenciar el TFR (Total Flow Rate, flujo total de ambas fases) y el FRR (Flow Rate Ratio, relación de flujos f_o/f_w)²⁶.

La optimización de todos estos factores, junto con la selección del micromezclador, conducirá a la producción de NPs con unos estándares de calidad uniformes. Los parámetros a optimizar son el tamaño, el PDI y el potencial zeta^{4,27}.

- El tamaño es un factor clave, relacionado tanto con la biodistribución y eliminación como con la captación celular de las NPs²⁸.
- El PDI define la dispersión en la distribución de tamaños. De forma general, los valores de PDI inferiores o iguales a 0.3 son considerados como aceptables, mientras que valores de PDI superiores corresponden a una mayor dispersión, lo que puede comprometer la eficacia y seguridad de la terapia²⁹.
- El potencial zeta (Z) determina la carga superficial de las NPs y también está relacionada de manera directa con la captación celular y la interacción con los entornos biológicos, observándose que la carga catiónica de las NPs se correlaciona con una mayor captación celular³⁰.

En este proyecto se plantea la encapsulación de un oligonucleótido antisentido (GapmeR) en NPHLPs para el tratamiento de la osteoporosis (OP). Estos GapmeRs (Figura 3) pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades que requieran suprimir la expresión de determinados genes que interfieren en el funcionamiento de ciertas rutas de señalización³².

Hipótesis

En la OP, se produce una pérdida de masa ósea y densidad mineral ósea, motivada por diversos factores. La estimulación de la vía canónica Wnt/ β -catenina promueve la formación ósea, siendo esta vía controlada de manera antagónica por la proteína Sfrp1 (Secreted frizzled related protein 1)³⁴. Por ello, el desarrollo de NPs dirigidas a silenciar el gen responsable de la síntesis de dicha proteína podría suponer una mejora de la OP.

Objetivos

Este trabajo forma parte de un proyecto presentado para la obtención de la beca de colaboración que, a su vez, es parte de un proyecto financiado (PID2021-127493OB-C21), cuyo objetivo general es el desarrollo de una formulación de NPHLPs para la administración intravenosa de un GapmeR con la finalidad de silenciar el gen SFRP1 como potencial terapia alternativa para el tratamiento de la OP. Estas NPHLPs deben presentar unas características fisicoquímicas, morfológicas y estructurales adecuadas para que se dirijan selectivamente al tejido óseo y ejerzan su acción específicamente en las células diana.

Objetivos concretos:

1. Establecimiento de las condiciones de complejación del GapmeR (molécula con carga negativa) con calcitonina (proteína con punto isoeléctrico elevado).
2. Elaboración, caracterización y estabilidad de NPHLPs. Puesta a punto y optimización del proceso de microfluídica, controlando tamaño, PDI y potencial Z de las NPs.
3. Funcionalización de la superficie de las NPHLPs con un aptámero con afinidad por células madre mesenquimales (MSC).
4. Evaluación de la internalización celular de las NPHLPs en cultivos de la línea celular C3HT10T1/2, células funcionalmente similares a las MSC.

Materiales y métodos

Materiales

Se emplearon 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; 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)- 2000] (DSPE- MPEG₂₀₀₀) (Nanosoft Polymers, Estados Unidos) con PM de 2748 g/mol; sulfato de protamina (Sigma Aldrich, Estados Unidos) con PM de 5000 g/mol; clorhidrato de 3β-[N-(Dimetilaminoetano)carbamoil] colesterol (DC-chol HCl) (Sigma Aldrich, Estados Unidos) con PM de 537 g/mol; 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- [maleimida (polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL) (Avanti Polar Lipids, Darmstadt, Alemania) con PM de 2941 g/mol; calcitonina de salmón (Sigma Aldrich, Estados Unidos) con PM de 3432 g/mol; cumarina, con PM de 146 g/mol (Sigma Aldrich, Estados Unidos); células mesenquimales primarias (línea celular C3H10T1/2) (ATCC, Estados Unidos) y preosteoblastos (línea celular MC3T3) (ATCC, Estados Unidos); GapmeR fluorescente (5'- AACACGTCTATACGC-3') (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos); aptámero (5'-GAATTCAGTCGGACAGCGACGACGGTGATATGTCAAGGTCGTATG CACGAGTCAGATGGACGAATATCGTCTCCC-3') (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos); suero bovino fetal (FBS) (Corning, Estados Unidos), tampón fosfato salino (PBS) (Corning, Estados Unidos), éter polietilenglicol terc-octilfeni (Tryton X-100) (Sigma Aldrich, Estados Unidos); etanol absoluto (PanReac Química SA, España), agua Milli-Q y acetonitrilo (Merck Millipore, Alemania).

Ensayo de complejación calcitonina-GapmeR

La calcitonina se trata de un péptido catiónico empleado para condensar el GapmeR y facilitar su encapsulación. Teniendo en cuenta el PM de ambos compuestos y el número de cargas disponibles para la condensación a pH 8, se calculó previamente la relación GapmeR-calcitonina. De acuerdo con estos cálculos, la relación debe ser de 1:2.78, comprobándose por electroforesis en gel de acrilamida el grado de complejación para 1:3, 1:6 y 1:12.

Elaboración de las NPHLPs

A.- Nanoprecipitación asistida por microfluídica

El proceso de elaboración de NPHLPs por microfluídica se rige por los siguientes pasos:

1. Preparación de la fo. Disolver 1.25 mg de PLGA en 1 mL de acetonitrilo. Paralelamente, se añade 1 µg de GapmeR a 11 µL de agua libre de ARNasa y se condensa con 4 µg de calcitonina disueltos en 14 µL de agua libre de ARNasa. Se espera 40 minutos para que se produzca la condensación. A continuación, se añaden 25 µL de la disolución de GapmeR y calcitonina a la fo (concentración de GapmeR de 0.04 mg/mL).
2. Preparación de la fw externa. Se disuelven por separado 0.2 mg de DSPE-MPEG₂₀₀₀ y 0.12 mg de DC-cholesterol HCl, en 1.5 mL de etanol al 4% y se mezclan agitando en vórtex.
3. Para asegurar la ausencia de fibras o partículas suspendidas, ambas fases fueron prefiltradas (0.45 µm, Merck Millipore, Alemania).
4. Se cargan dos jeringas de 10mL con la fw en una bomba de jeringa, programada para un flujo total de 0.6 mL/min (0.3 mL/min/jeringa) y se conectan con el micromezclador.
5. De la misma manera, se carga la bomba responsable de la eyección de la fo, estando también conectada con el micromezclador. El flujo se fijó en 0.2 mL/min.
6. Se activan ambas bombas y se inicia el proceso de micromezclado, recogiendo las NPHLP en un vaso de precipitado bajo agitación, manteniéndose en campana de extracción durante 2 horas para evaporar el disolvente orgánico.
7. Seguidamente, se extraen 100 µL para su caracterización fisicoquímica. El resto del lote se concentra por filtración con filtros Amicon Ultra-15 (peso molecular de corte de 100 kDa, Merck Millipore, Alemania) en centrífuga (10 minutos, 10.000 rpm, temperatura ambiente). El concentrado se resuspende en un volumen de 400 µL con agua Milli-Q y de él se extraen 10 µL para su caracterización.

B.- Nanoprecipitación convencional

1. Se preparan ambas fases siguiendo el procedimiento anterior, utilizando la misma formulación.
2. Se adiciona 1 mL de la fo sobre 3 mL de la dispersión acuosa de lípidos bajo agitación magnética, manteniéndose en campana de extracción durante 2 horas.
3. Caracterización de las NPs siguiendo el protocolo.

Caracterización de las NPHLPs elaboradas

1. Ensayo de encapsulación y liberación del GapmeR

Para poder cuantificar el porcentaje de GapmeR encapsulado, se concentran las NPs y se mide la fluorescencia del subnadante en un lector de microplacas a una longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 528 nm, respectivamente. La concentración de oligonucleótido no encapsulado se estimó a partir de la recta de calibrado, validada en el intervalo de concentraciones de 12-413 ng/mL. El cálculo de la eficiencia de encapsulación (%EE) se realiza por diferencia con el total añadido (100%). A las 24 y 48 horas, se vuelve a medir el subnadante para determinar la liberación del oligonucleótido.

2. Caracterización fisicoquímica de las NPs

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

3. Estabilidad de las NPHLPs

Se determina la evolución de las características fisicoquímicas después de la incubación de las NPs durante 2, 16 y 24 horas en PBS, a 4°, y en FBS 2% y FBS 10%, a 37°.

Funcionalización con aptámero

La funcionalización de las NPs se llevó a cabo por dos procedimientos: conjugación química y adsorción física. El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Elaboración de las NPHLPs siguiendo el procedimiento anterior. Para la conjugación química, el total de 0.2 mg de DSPE-MPEG₂₀₀₀ se reparte en 0.173 mg de DSPE-MPEG₂₀₀₀ y 0.025 mg de DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL. El DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL permite la unión covalente por reacción con el grupo imida.
2. Paralelamente, se activa el aptámero con tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) y se añade un cierto volumen de esta disolución a cada lote.
3. Transcurrida 1 hora, se concentran las NPs para eliminar el aptámero que no se ha unido, se resuspenden y se mide la fluorescencia a 590/645 nm. A las 24h, se vuelve a determinar para valorar si la funcionalización es estable.

Ensayo de internalización

Se realiza con NPHLPs marcadas con cumarina (10 µL en la fase orgánica) sin aptámero frente a funcionalizadas. Procedimiento a seguir:

1. Cultivo de células C3H10T1/2 hasta confluencia del 80% en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado. Se despegan y siembran 1×10^4 células/pocillo en placas de 96.
2. Después de 24h, se retira el medio y se lava dos veces con DPBS.
3. Preparar la suspensión de NPs (concentración 1.96 mg/mL) en medio de cultivo suplementado y medir la fluorescencia inicial a 485/528 nm. Añadir 200 µL/ pocillo.
4. Incubar 2 horas y retirar el medio para lavar con DPBS, eliminando así las NPs no internalizadas.
5. Lisar las células con Tryton X-100 (1%, 15 min) y medir la fluorescencia, determinándose el porcentaje de internalización por diferencia.

Resultados y discusión

Es necesario destacar que, para que este apartado tenga validez estadística, los lotes se han realizado por triplicado y los resultados se han expresado como la media aritmética de estos con su respectiva desviación estándar.

Caracterización fisicoquímica de las NPHLPs

En primer lugar, se van a comparar los resultados obtenidos por nanoprecipitación convencional con la asistida por microfluídica (Tabla 3), empleando en ambas la formulación ya descrita.

Método	Tamaño medio (nm)	Índice de polidispersión (PDI)	Potencial Z (mV)
Nanoprecipitación convencional	177.2 ± 7.2	0.21 ± 0.05	21.5 ± 4.2
Nanoprecipitación asistida por microfluídica	147.6 ± 7.8	0.13 ± 0.01	26.5 ± 3.5

Tabla 3. Tamaño medio, índice de polidispersión y potencial Z de las NPHLPs obtenidas tanto por nanoprecipitación convencional como por nanoprecipitación asistida por microfluídica.

En consonancia con lo comentado, las NPHLPs obtenidas por microfluídica presentan un tamaño medio e índice de polidispersión menor que las producidas por el método convencional, atribuible en gran parte a la alta relación área superficial/volumen. Con respecto al potencial Z, ambos valores son muy similares entre sí, dado que la formulación empleada fue la misma y los lípidos que se han empleado y que se auto-ensamblan sobre el núcleo polimérico son de carga positiva.

Una vez comparados ambos métodos y continuando con la microfluídica, se elaboran tres lotes de NPHLPs, los cuales se medirán antes (nativas) y después de concentrar. Tal y como refleja la Tabla 4, tanto el tamaño medio como el PDI no varían significativamente tras concentrar las NPs, lo que se debe al empleo de lípidos pegilados, que actúan como surfactantes, evitando así procesos de agregación.

NPHLPs	Tamaño medio (nm)	Índice de polidispersión (PDI)	Potencial Z (mV)
Nativas	14.4 ± 5.6	0.17 ± 0.04	28.7 ± 6.6
Concentradas	155.4 ± 11.4	0.21 ± 0.01	25.9 ± 2.3

Tabla 4. Tamaño medio, índice de polidispersión y potencial Z de las NPHLPs, obtenidas por nanoprecipitación asistida por microfluídica, antes y después del proceso de concentración.

Evaluación de la estabilidad de las NPHLPs

A continuación, dado que las NPs se pueden concentrar, se mide la estabilidad de las mismas (concentradas) a las 2, 16 y 24 horas en diferentes medios: PBS pH 7.4, FBS 2% y FBS 10% (Tabla 7), para cerciorarnos de que los lotes elaborados mantienen sus características fisicoquímicas y, por ende, son estables para su posterior administración en animales de experimentación, continuando así la valoración de estas NPs.

Medio empleado y tiempo medido	Tamaño medio (nm)	Índice de polidispersión (PDI)	Potencial Z (mV)
Agua Milli-Q	151.4 ± 3.5	0.16 ± 0.05	20.4 ± 2.9
PBS pH 7.4 2h	150.0 ± 6.1	0.08 ± 0.02	-8.5 ± 1.6
PBS pH 7.4 16h	160.1 ± 3.6	0.23 ± 0.01	-14.4 ± 1.9
PBS pH 7.4 24h	154.4 ± 5.4	0.17 ± 0.01	-8.1 ± 1.4
FBS 2% 2h	155.5 ± 2.4	0.21 ± 0.04	-10.0 ± 1.5
FBS 2% 16h	163.3 ± 3.9	0.22 ± 0.02	-11.2 ± 0.8
FBS 2% 24h	143.3 ± 11.7	0.18 ± 0.03	-23.9 ± 2.5
FBS 10% 2h	150.5 ± 8.8	0.16 ± 0.06	-19.9 ± 0.4
FBS 10% 16h	165.9 ± 3.3	0.26 ± 0.03	-17.2 ± 2.4
FBS 10% 24h	137.9 ± 3.3	0.14 ± 0.03	-18.9 ± 0.9

Tabla 5. Estabilidad referida a tamaño medio, índice de polidispersión y potencial Z de las NPHLPs en distintos medios: PBS pH 7.4, FBS 2% y FBS 10%; y a distintos tiempos: 2, 16 y 24 horas. En este caso, se mide la estabilidad en FBS dado que, posteriormente, el ensayo de internalización requiere el empleo de este medio.

La Tabla 5 recoge los resultados obtenidos y refleja que las NPs son estables a los tres tiempos y en los tres medios, siendo el aumento del tamaño ≤ 15 nm y sin variación significativa en el PDI. Con respecto al potencial Z, este es negativo dado que es la carga que proporcionan los medios.

Evaluación de la eficiencia de encapsulación y liberación del GapmeR

Como se ha mencionado anteriormente, para determinar la %EE, es necesario elaborar una recta de calibrado con concentraciones conocidas. La ecuación de la recta de calibrado obtenida fue la siguiente:

- $y = 20,915x$, donde y representa la fluorescencia y x la concentración del GapmeR en ng/mL; $R^2 = 0,998$, siendo el coeficiente de correlación muy próximo a 1, ajustándose a la linealidad. La recta pasa por el punto (0,0) dado que se ha corregido por las interferencias emitidas por las NPs sin oligonucleótido.

En la Tabla 6 se recogen los resultados y se observa una %EE cercana al 100%, lo que respalda que el análisis previo de la complejación calcitonina-GapmeR fue adecuado y la relación empleada (1:3) la correcta. La liberación del agente activo fue medida a las 24h y 48h (Tabla 6), siendo estos resultados de interés en una administración sistémica dado que permite a las NPs alcanzar el tejido diana sin haber perdido gran parte del oligonucleótido.

Ensayo de encapsulación y liberación del GapmeR	
Eficiencia de encapsulación (%EE)	97.61 ± 1.48
% GapmeR liberado a las 24h	26.61 ± 2.46
% GapmeR liberado a las 48h (% acumulado)	96.55 ± 3.02

Tabla 6. Resultados del ensayo de encapsulación y liberación del GapmeR a las 24 y 48 horas.

Evaluación de la funcionalización e internalización de las NPHLPs

En primer lugar, se caracterizan las NPs formuladas con DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL, para corroborar que la adición de este lípido no altera su tamaño ni el PDI, tal y como se observa en la Tabla 7. Además, se caracterizan las NPs tras el proceso de funcionalización mediante conjugación química y adsorción física y se compara con muestras a las que no se adiciona el aptámero (controles), observándose que la incorporación de este no influye en las características fisicoquímicas de las NPs (Tabla 7).

Proceso de funcionalización	DSPE-PEG ₂₀₀₀ MAL	Tamaño medio (nm)	Índice de polidispersión (PDI)	Potencial Z (mV)
Conjugación química	Sí	158.3 ± 6.7	0.13 ± 0.03	25.4 ± 5.5
Ninguno (control)		155.1 ± 3.4	0.10 ± 0.02	24.5 ± 4.4
Adsorción física	No	160.3 ± 5.2	0.15 ± 0.02	22.4 ± 3.6
Ninguno (control)		158.1 ± 3.6	0.16 ± 0.04	25.2 ± 4.6

Tabla 7. Tamaño medio, PDI y potencial Z de las NPHLPs funcionalizadas y sus respectivos controles.

A continuación, se lleva a cabo la determinación de la eficiencia de funcionalización a las 2h y 24h (Tabla 8). Por ambos métodos, el porcentaje de funcionalización es próximo al 100%, por lo que el aptámero es capaz de unirse con alta afinidad tanto al DSPE-PEG₂₀₀₀MAL como a la cubierta externa de las NPs. No obstante, se observa que, a las 24h, se desorbe aproximadamente un 27% del aptámero unido por adsorción, siendo este un resultado predecible dado que, por este método, las uniones del aptámero a las NPs son débiles y no mediante enlaces covalentes, como sí ocurre en la conjugación química.

Por otro lado, se determina el porcentaje de internalización de las NPs, funcionalizadas mediante conjugación química, en células mesenquimales y se compara con el obtenido al emplear NPs no funcionalizadas (blancas). En base a los

resultados (Tabla 8), se puede observar que el porcentaje de internalización con ambos tipos de NPs es prácticamente el mismo, dado que, como se ha señalado, la funcionalización de las mismas no afecta a sus características fisicoquímicas. Estos resultados indican también que el aptámero no es lo suficientemente específico para esta línea celular, siendo necesario buscar otro aptámero más específico.

Ensayo de funcionalización			
Eficiencia de funcionalización (%)	Conjugación química	t=0	98.40 ± 0.49
		24h	98.32 ± 0.38
	Adsorción física	t=0	98.57 ± 0.97
		24h	72.54 ± 1.12
Ensayo de internalización			
Porcentaje de internalización (%)	Funcionalizadas	7.92 ± 0.58	
	Blancas	7.41 ± 0.49	

Tabla 8. Resultados relativos al ensayo de funcionalización e internalización celular de las NPHLPs.

Conclusiones

El análisis detallado de los resultados obtenidos experimentalmente permite concluir lo siguiente:

- El empleo de la microfluídica como alternativa al método convencional permite obtener NPs híbridas con un menor tamaño e índice de polidispersión, sin afectar al potencial zeta de las mismas.
- Debido a su acción como agente surfactante, la adición de DSPE-MPEG₂₀₀₀ posibilita la concentración de las NPs y evita los procesos de agregación, favoreciendo así la estabilidad de la suspensión hasta al menos 24h tras su producción.
- La funcionalización con aptámero, mediante conjugación química y adsorción física, no afectan a las características fisicoquímicas de las NPHLPs. La funcionalización covalente es más estable que la adsorción física.
- La electroforesis en gel de acrilamida y el posterior ensayo de encapsulación, respaldan el empleo de la calcitonina en la condensación del oligonucleótido, obteniéndose una %EE cercana al 100% y una escasa liberación del GapmeR a tiempo corto.
- El porcentaje de internalización de las NPs funcionalizadas y no funcionalizadas en células mesenquimales es similar. Por tanto, el aptámero no es lo suficientemente específico para el fin que se persigue.

En resumen, la producción de NPHLPs, cargadas con GapmeR y funcionalizadas con aptámero, mediante nanoprecipitación asistida por microfluídica, constituye el punto de partida continuar con futuros ensayos in vitro e in vivo con el objetivo de mejorar la terapia génica en el tratamiento de determinadas enfermedades óseas.

Bibliografía

1. 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; 14:1937–52. DOI: 10.2147/IJN.S198353
2. Burgess P, Hutt PB, Farokhzad OC, Langer R, Minick S, Zale S. On firm ground: IP protection of therapeutic nanoparticles. *Nat Biotechnol*. 2010; 28(12):1267–70. DOI: 10.1038/nbt.1725
3. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*. 2009; 3(1):16–20. DOI: 10.1021/nn900002m
4. Zhang L, Chen Q, Ma Y, Sun J. Microfluidic methods for fabrication and engineering of nanoparticle drug delivery systems. *ACS Appl Bio Mater*. 2020; 3(1):107–20. DOI: 10.1021/acsabm.9b00853
5. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med*. 2019; 4(3). DOI: 10.1002/btm2.10143
6. 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). DOI: 10.1186/1556-276X-8-102
7. 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*. 2022; 46(100570):100570. DOI: 10.1016/j.colcom.2021.100570
8. Chan JM, Valencia PM, Zhang L, Langer R, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticles for drug delivery. En: *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 163–75.
9. Zhang L, Chan JM, Gu FX, Rhee J-W, Wang AZ, Radovic-Moreno AF, et al. Self-assembled Lipid–Polymer hybrid nanoparticles: A robust drug delivery platform. *ACS Nano*. 2008; 2(8):1696–702. DOI: 10.1021/nn800275r

10. Wakaskar RR. General overview of lipid–polymer hybrid nanoparticles, dendrimers, micelles, liposomes, spongosomes and cubosomes. *J Drug Target*. 2018; 26(4):311–8. DOI: 10.1080/1061186X.2017.1367006
11. Maged A, Abdelbaset R, Mahmoud AA, Elkasabgy NA. Merits and advances of microfluidics in the pharmaceutical field: design technologies and future prospects. *Drug Deliv*. 2022; 29(1):1549–70. DOI: 10.1080/10717544.2022.2069878
12. Thevenot J, Troutier A-L, David L, Delair T, Ladavière C. Steric stabilization of lipid/polymer particle assemblies by poly(ethylene glycol)-lipids. *Biomacromolecules*. 2007; 8(11):3651-60. DOI: 10.1021/bm700753q
13. Casadevall i Solvas X, deMello A. Droplet microfluidics: recent developments and future applications. *Chem Commun (Camb)*. 2011; 47(7):1936–42. DOI: 10.1039/C0CC02474K
14. Wang C-T, Hu Y-C, Hu T-Y. Biophysical micromixer. *Sensors (Basel)*. 2009; 9(7):5379-89. DOI: 10.3390/s90705379
15. Beebe DJ, Mensing GA, Walker GM. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annu Rev Biomed Eng*. 2002; 4(1):261-86. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916
16. Shanko E-S, van de Burgt Y, Anderson PD, den Toonder JMJ. Microfluidic magnetic mixing at low Reynolds numbers and in stagnant fluids. *Micromachines (Basel)*. 2019; 10(11):731. DOI: 10.3390/mi10110731
17. Salafi T, Zeming KK, Zhang Y. Advancements in microfluidics for nanoparticle separation. *Lab Chip*. 2017; 17(1):11-33. DOI: 10.1039/c6lc01045h
18. Niculescu A-G, Chircov C, Bîrcă AC, Grumezescu AM. Nanomaterials synthesis through microfluidic methods: An updated overview. *Nanomaterials (Basel)*. 2021; 11(4):864. DOI: 10.3390/nano11040864
19. Khan IU, Serra CA, Anton N, Vandamme TF. Production of nanoparticle drug delivery systems with microfluidics tools. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015; 12(4):547-62. DOI: 10.1517/17425247.2015.974547

20. Li Y, Lee RJ, Huang X, Li Y, Lv B, Wang T, et al. Single-step microfluidic synthesis of transferrin-conjugated lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Nanomedicine*. 2017; 13(2):371-81. DOI: 10.1016/j.nano.2016.09.014
21. Martins JP, Torrieri G, Santos HA. The importance of microfluidics for the preparation of nanoparticles as advanced drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*. 2018; 15(5):469-79. DOI: 10.1080/17425247.2018.1446936
22. Chan JM, Zhang L, Yuet KP, Liao G, Rhee J-W, Langer R, et al. PLGA–lecithin–PEG core–shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*. 2009; 30(8):1627-34. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.013
23. Clawson C, Ton L, Aryal S, Fu V, Esener S, Zhang L. Synthesis and characterization of lipid–polymer hybrid nanoparticles with pH-triggered poly(ethylene glycol) shedding. *Langmuir*. 2011; 27(17):10556-61. DOI: 10.1021/la202123e
24. Kandel PK, Fernando LP, Ackroyd PC, Christensen KA. Incorporating functionalized polyethylene glycol lipids into reprecipitated conjugated polymernanoparticles for bioconjugation and targeted labeling of cells. *Nanoscale*. 2011; 3(3):1037-45. DOI: 10.1039/c0nr00746c
25. Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 2011; 6(4):715-28. DOI: 10.2217/nnm.11.19
26. Zhigaltsev IV, Belliveau N, Hafez I, Leung AKK, Huft J, Hansen C, et al. Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing. *Langmuir*. 2012; 28(7):3633-40. DOI: 10.1021/la204833h
27. 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
28. Barar J. Bioimpacts of nanoparticle size: why it matters? *BiolImpacts*. 2017; 5(3):113-5. DOI: 10.15171/bi.2015.23
29. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh 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
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):1603-11. DOI: 10.1016/j.nano.2015.04.015
 31. Lim KRQ, Yokota T. Invention and early history of gapmers. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US; 2020. p. 3-19.
 32. Chan L, Yokota T. Development and Clinical Applications of Antisense Oligonucleotide Gapmers. En: *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US; 2020. p. 21-47.
 33. Lundin KE, Gissberg O, Smith CIE. Oligonucleotide therapies: The past and the present. *Hum Gene Ther*. 2015; 26(8):475-85. DOI: 10.1089/hum.2015.070
 34. García-García P, Reyes R, García-Sánchez D, Pérez-Campo FM, Rodríguez-Rey JC, Évora C, et al. Nanoparticle-mediated selective Sfrp-1 silencing enhances bone density in osteoporotic mice. *J Nanobiotechnology*. 2022; 20(1). DOI: 10.1186/s12951-022-01674-5
 35. Gajbhiye KR, Salve R, Narwade M, Sheikh A, Kesharwani P, Gajbhiye V. Lipid polymer hybrid nanoparticles: a custom-tailored next-generation approach for cancer therapeutics. *Mol Cancer*. 2023; 22(1). DOI: 10.1186/s12943-023-01849-0
 36. Bennett CF, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense oligonucleotide therapies for neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*. 2019; 42(1):385-406. DOI: 10.1146/annurev-neuro-070918-050501