



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Pegilación y liofilización de nanopartículas sólidas lipídicas con colesterol oleato como vectores de ácidos nucleicos

David Andrés Narváez Narváez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

**PEGILACIÓN Y LIOFILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
SÓLIDAS LIPÍDICAS CON COLESTERIL OLEATO
COMO VECTORES DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

David Andrés Narváez Narváez

2024

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y
CONTROL DE MEDICAMENTOS

**PEGILACIÓN Y LIOFILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
SÓLIDAS LIPÍDICAS CON COLESTERIL OLEATO COMO
VECTORES DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Memoria presentada por David Andrés Narváez Narváez para optar al título de doctor
por la Universidad de Barcelona

Directores de la tesis:

Dr. Marc Suñé Pou

Dr. Carles María Suñé Negre

Doctorando:

David Andrés Narváez Narváez

Tutor:

Dr. Josep María Suñé Negre

DAVID ANDRÉS NARVÁEZ NARVÁEZ,
Barcelona, 2024

*Para mi Milena de mi corazón, que por ella vale todo el
esfuerzo invertido en esta inquietante pero fascinante
aventura*

AGRADECIMIENTOS

Al indagar en el significado de la palabra “agradecer”, descubrí que proviene del latín “*gratus*”, lo cual refleja perfectamente mi sentir al concluir este proyecto. Siento una profunda gratitud hacia el Cosmos, o como muchos lo llaman, Dios, ya que el mismo día que me enteré del embarazo de mi esposa, recibí la aceptación del grupo de investigación para llevar a cabo la tesis doctoral. Por esta razón, dedico este logro especialmente a mi Milena.

Este proyecto ha sido un gran desafío para mí, pero siempre mantuve presente que, si el Cosmos me brindaba esta oportunidad, era porque tenía la capacidad de superarlo. Y lo logré, con la bendición de Dios y el invaluable apoyo de muchas personas que me han acompañado, guiado y alentado a lo largo de este camino.

Agradezco especialmente a mi querida esposa por estar SIEMPRE a mi lado, en los momentos buenos y complicados, brindándome su constante respaldo en cada paso del camino. Su sacrificio y dedicación, incluso en las noches difíciles y en el cuidado de nuestra hija, han sido fundamentales para el éxito de este proyecto.

También debo expresar mi agradecimiento al apoyo incondicional de mis padres, cuya guía ha sido un pilar fundamental en mi vida. Sin su ayuda y las oportunidades que me han brindado, no habría podido alcanzar mis metas profesionales. Su ejemplo de entrega y sacrificio por los hijos es un legado que aplicaré en la crianza de mi hija, procurando ofrecerle las mismas oportunidades o incluso mejores para enfrentar un mundo tan competitivo como este.

Además de dedicar este trabajo a mi hija, también quiero dedicárselo a una persona muy especial para mí, mi abuelita Lileth Molina. A pesar de que nos hemos privado de pasar tiempo juntos durante todo este tiempo, nos llena de satisfacción haber cumplido con la meta deseada. Asimismo, quiero expresar mi gratitud a mi diseñadora gráfica favorita, Adriana Valdez Narváez, por dedicar todo su talento y esfuerzo en la elaboración del resumen gráfico del artículo y la increíble portada de esta tesis doctoral.

De igual manera, agradezco a mis suegros, Martha y José, quienes estuvieron respaldándome en el último tramo para la culminación de la tesis, sobre todo mi suegro, quien compartió su conocimiento en el sector público de la salud, aportando ideas y sugerencias para el desarrollo de los objetivos sostenibles.

Un grato agradecimiento a la Dra. Encarna García, por facilitar el contacto que permitió la realización de esta tesis doctoral en el departamento de Tecnología Farmacéutica. Al Dr. Josep M^a Suñé, por su orientación y apoyo constante a lo largo de este proceso. A la Dra. María Antonia Busquets, por proporcionar los recursos y equipos necesarios para determinar las características fisicoquímicas de las nanopartículas. Un agradecimiento especial a la Dra. Marisa García, cuya ayuda ha sido clave para culminar con éxito esta tesis doctoral. También agradezco al personal

de la Unidad de Criomicroscopía Electrónica (CCiT-UB) y al Servicio de Análisis Térmico y Calorimetría (IQAC-CSIC) por su asistencia técnica y apoyo constante siempre que lo necesitaba.

Expreso mi gratitud a todas las personas y colegas del departamento de Tecnología Farmacéutica, cuyos consejos y sugerencias fueron de ayuda en este largo recorrido. También agradezco a las personas de Granada por su disposición y colaboración con los ensayos biológicos siempre que lo necesité, a pesar de no haber tenido la oportunidad de conocerlos en persona.

Por último, a mis directores, Dr. Carles Suñé y Dr. Marc Suñé. A Carles, por aceptar dirigir esta tesis doctoral y por su constante disposición a brindar respaldo. Igualmente, por su tolerancia y contribución para que este trabajo de investigación haya concluido de una manera exitosa.

A Marc, mi más profundo agradecimiento por haberme dado la oportunidad de poder realizar esta tesis con él, de aceptar su dirección, pero sobre todo por su paciencia inagotable, siempre tratando de ayudarme, a pesar de que muchas veces lo puse de cabeza. Más que un director, ha sido un amigo. Este trabajo y todo el esfuerzo invertido no hubieran sido posibles sin su ayuda y apoyo incondicional.

NOTA DEL AUTOR:

Se informa que se han adjuntado figuras de artículos y/o páginas webs, las cuales están debidamente referenciadas. Es importante destacar que **NO se pretende infringir los derechos de autor** en ninguno de los casos, ya que se trata de **un uso con fines educativos y sin ánimo de lucro en lugar de con propósitos comerciales.**

RESUMEN

Las nanopartículas catiónicas sólidas lipídicas (cSLN) han surgido como una herramienta prometedora en terapias genéticas y de ARN. Esta investigación se enfocó en mejorar la formulación existente de SLNs con colesteryl oleato (CO-cSLNs), incorporando polietilenglicol (PEG) en su superficie para desarrollar nuevas formulaciones de PEG-cSLNs. La PEGilación se identifica como un factor relevante para mejorar la estabilidad y protección de estas nanopartículas, junto con la optimización del proceso de liofilización para preservar sus propiedades fisicoquímicas. Además, se enfatiza la reducción del tamaño de partícula mediante métodos físicos y químicos para optimizar la formulación.

Se ha evaluado exhaustivamente el impacto del PEG en las características fisicoquímicas y biológicas de las CO-cSLNs para comprender su efecto en los atributos críticos de calidad (CQA), analizando parámetros como el tamaño de partícula (PSD), índice de poldispersidad (Pdl), potencial zeta (ZP), morfología, estabilidad, citotoxicidad y eficiencia de carga. Se identificó la combinación óptima de excipientes para la PEGilación y se establecieron las condiciones ideales para la liofilización.

Se desarrollaron y compararon cinco formulaciones diferentes de PEG-cSLNs en estado suspendido sin liofilizar y liofilizado, evaluando los parámetros del ciclo de liofilización y la reducción del tamaño de partícula mediante ajustes en la ultra agitación y la incorporación de cistamina como excipiente adicional. Se identificaron los parámetros críticos de proceso (CPP) que afectan la estabilidad de las nanopartículas liofilizadas, estableciendo así un proceso de liofilización optimizado. Se determinó que la sacarosa, con una concentración del 20%, actuaba eficazmente como crioprotector.

En suspensión acuosa sin liofilizar, las formulaciones de PEG-cSLNs presentaron tamaños de partícula alrededor de 170 nm, mientras que liofilizadas con una receta convencional oscilaron entre 200 y 300 nm, con valores de potencial zeta entre 30 y 35 mV. A pesar de lograr reducir el tamaño de partícula (120–130 nm), las PEG-cSLNs con cistamina experimentaron cambios drásticos en sus propiedades fisicoquímicas durante la liofilización, incluso con la receta optimizada, sugiriendo la necesidad de estandarizar un nuevo proceso.

Sin embargo, se obtuvieron PEG-cSLNs estables y biocompatibles, con una morfología aceptable y con la capacidad de formar complejos con material genético, representando un recurso potencial para ensayos *in vivo*. Esta investigación contribuye al desarrollo y

comprensión de las CO-cSLNs PEGiladas, destacando la importancia de la PEGilación para mejorar su estabilidad y la necesidad de abordar desafíos específicos relacionados con la liofilización para futuras investigaciones biomédicas. Estas nanopartículas presentan un potencial prometedor para diversas aplicaciones biomédicas, especialmente en el ámbito de las terapias genéticas y de ARN.

ABSTRACT

Cationic Solid Lipid Nanoparticles (cSLNs) have emerged as a promising tool in genetic and RNA therapies. This research aimed to enhance the existing formulation of SLNs using cholesteryl oleate (CO-cSLNs) as a lipid matrix, by incorporating polyethylene glycol (PEG) on their surface to develop new PEG-cSLNs formulations. PEGylation is identified as a crucial factor in improving the stability and protection of these nanoparticles, along with optimizing the lyophilization process to preserve their physicochemical properties. Additionally, emphasis was placed on reducing particle size through physical and chemical methods to optimize the formulation.

The impact of PEG on the physicochemical and biological characteristics of CO-cSLNs was exhaustively assessed to understand its effect on critical quality attributes (CQA), analyzing parameters such as particle size distribution (PSD), polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), morphology, stability, cytotoxicity, and loading efficiency. The most effective combination of excipients for PEGylation was determined, and optimal conditions for lyophilization were defined.

Five different formulations of PEG-cSLNs were developed and compared in both suspended non-lyophilized and lyophilized conditions, evaluating lyophilization cycle parameters and particle size reduction through adjustments in ultra-stirring and the inclusion of cystamine as an additional excipient. Critical process parameters (CPP) affecting the stability of lyophilized nanoparticles were identified, establishing an optimized lyophilization process. Notably, sucrose at a concentration of 20% was determined as an effective cryoprotectant.

In aqueous suspension without lyophilized, PEG-cSLNs formulations exhibited particle sizes around 170 nm. However, in lyophilized formulations using a conventional recipe, particle sizes ranged between 200 and 300 nm, with zeta potential values between 30 to 35 mV. Despite achieving particle size reduction (120–130 nm), PEG-cSLNs with cystamine experienced significant alterations in their physicochemical properties during lyophilization, even with the optimized recipe, suggesting the need for standardizing a new process.

Nevertheless, stable, and biocompatible PEG-cSLNs were successfully obtained, exhibiting acceptable morphology and the capacity to form complexes with genetic material, representing a potential resource for *in vivo* assays. This research contributes to the development and comprehension of PEGylated CO-cSLNs, highlighting the

importance of PEGylation in improving their stability and the need to address specific challenges associated with lyophilization for future biomedical research. These nanoparticles have promising potential for diverse biomedical applications, particularly within the field of gene and RNA therapies.

OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE Y PERSPECTIVA DE GÉNERO

La presente tesis doctoral contribuye a la consecución de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) y considera la perspectiva de género de la siguiente manera:

En primer lugar, la investigación se alinea con el **Objetivo número 3 (Salud y Bienestar)**, cuyo propósito es *garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades*. Específicamente, el enfoque en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, como las nanopartículas sólidas lipídicas PEGiladas (PEG-SLNs), para llevar a cabo terapia génica y/o terapias con ARN, tiene el potencial de mejorar la calidad de vida de aquellos que padecen trastornos genéticos, un segmento importante de la población que a menudo se encuentra en grupos vulnerables. Esto se logra al mejorar la eficacia de los tratamientos médicos y promover la salud y el bienestar mediante una liberación controlada y dirigida de medicamentos. De igual manera, esta iniciativa podría tener un impacto positivo en la economía, tanto a nivel público como privado, al hacer que los tratamientos sean más accesibles para personas de diversas situaciones socio económicas.

Además, el trabajo realizado en esta tesis doctoral contribuye indirectamente al **Objetivo de Desarrollo número 8**, que busca *promover el crecimiento económico inclusivo y sostenible, el empleo y el trabajo decente para todos*. La creación de estos medicamentos no solo implica mejoras en la salud de la población que los necesita, sino que también puede generar una mayor inversión en investigación, impulsando nuevas líneas de investigación y creando nuevas oportunidades laborales. Esto fomenta un desarrollo tecnológico sostenible y contribuye a un entorno de competencia e innovación justas.

En relación con el punto anterior, el trabajo también estaría a fin con el **Objetivo número 9 (Industria, Innovación e Infraestructura)**, al *promover la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías* (PEG-SLNs), contribuyendo al avance de la infraestructura científica y tecnológica. Asimismo, promueve la innovación y la sostenibilidad en el sector de la salud. Es primordial destacar que estos objetivos son importantes para cumplir con las “metas” propuestas por la Organización Mundial de la Salud para el año 2030.

Finalmente, cabe señalar que, debido a la naturaleza molecular y básica de esta formulación de PEG-cSLNs, el diseño experimental no se ve influenciado por

consideraciones de género, razón por la cual, no se ha tenido en cuenta en el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE

RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	13
OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE Y PERSPECTIVA DE GÉNERO.....	15
ABREVIACIONES	23
1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1 ENFOQUES INNOVADORES EN FARMACIA GALÉNICA: DESAFÍOS Y OPORTUNIDADES EN TERAPIA GÉNICA Y TERAPIAS DE ADN/ARN	29
1.1.1 ANTECEDENTES DE LA TERAPIA GÉNICA	30
1.1.2 ACTUALIDAD DE LAS TERAPIAS GÉNICAS.....	30
1.1.3 HERRAMIENTAS PARA TERAPIA GÉNICA.....	33
1.1.3.1 Nucleasas con Dedos de Zinc (ZFNs).....	33
1.1.3.2 Nucleasa de Actividad Similar al Activador de Transcripción (TALENs) .	35
1.1.3.3 Trans-Empalme de ARN Mediado por Empalmosoma (SMaRT)	35
1.1.3.4 Sistema CRISPR-Cas9	36
1.1.3.5 Plásmidos	37
1.1.3.6 Secuencias Cortas de ARN no Codificante.....	39
1.1.4 APLICACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DE LA TERAPIA GÉNICA...	41
1.1.5 POTENCIALES RIESGOS Y LIMITACIONES DE LA TERAPIA GÉNICA	41
1.2 VECTORES VIRALES (VV)	43
1.2.1 ANTECEDENTES DE LOS VV	46
1.2.2 VENTAJAS DE LOS VV	46
1.2.3 DESVENTAJAS DE LOS VV	49
1.3 NANOTECNOLOGÍA Y VECTORES NO VIRALES (VNV)	50
1.3.1 NANOMATERIALES	51
1.3.2 VECTORES NO VIRALES (VNV)	53
1.3.3 VENTAJAS DE LOS VNV	56
1.3.4 DESVENTAJAS DE LOS VNV.....	58
1.4 NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS (SLN).....	59
1.4.1 EXCIPIENTES UTILIZADOS PARA FABRICAR SLNs	60
1.4.2 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE SLNs.....	62
1.4.2.1 Homogenización en Caliente.....	63
1.4.2.2 Método de Emulsificación-Evaporación del Solvente	63
1.4.2.3 Coacervación Iónica	63
1.4.2.4 Método de Precipitación por Dispersión de Solvente.....	64
1.4.2.5 Método con Ultrasonido.....	64
1.4.2.6 Método Microfluídico	64
1.4.2.7 Método Micromulsificación Caliente	65
1.5 FORMACIÓN DE COMPLEJOS ENTRE cSLNs Y ÁCIDOS NUCLEICOS.....	67
1.6 PEGILACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	69
1.7 LIOFILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	73
1.7.1 ANTECEDENTES DE LA LIOFILIZACIÓN	74
1.7.2 PROCESO DE LA LIOFILIZACIÓN	75
1.7.3 MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE CALOR.....	78

1.7.4	CRIOPROTECTORES	79
1.7.5	VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA LIOFILIZACIÓN	80
2.	OBJETIVOS	83
2.1	OBJETIVOS.....	85
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	89
3.1	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	91
3.1.1	SECCIÓN GALÉNICA.....	91
3.1.2	SECCIÓN BIOLÓGICA	92
3.2	METODOLOGÍA	94
3.2.1	SECCIÓN GALÉNICA.....	94
3.2.1.1	Fabricación de las PEG-cSLNs	94
3.2.1.2	Liofilización de las PEG-cSLNs	95
3.2.1.3	Caracterización Físicoquímica y Morfológica de las PEG-cSLNs.....	97
3.2.1.4	Análisis de Factores en las PEG-cSLNs	101
3.2.1.5	Estudio y Optimización del Proceso de Liofilización	101
3.2.1.6	Reducción de Tamaño de Partícula de las PEG-cSLNs	104
3.2.1.7	Estudio de Estabilidad de las PEG-cSLNs.....	105
3.2.2	SECCIÓN BIOLÓGICA	105
3.2.2.1	Estudio de Viabilidad Celular con las PEG-cSLNs.....	105
3.2.2.2	Formación de Complejos con Material Genético y Eficiencia de Carga de las PEG-cSLNs.....	108
3.2.2.3	Ensayo de Transfección con Plásmido Luciferasa mediante las PEG-cSLNs	109
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	113
4.1	SECCIÓN GALÉNICA	115
4.1.1	PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LAS FORMULACIONES	115
4.1.1.1	Estudio Factorial.....	115
4.1.1.2	Optimización de las Propiedades Físicoquímicas en la Fabricación de las PEG-cSLNs	117
4.1.2	LIOFILIZACIÓN DE LAS PEG-cSLNs	120
4.1.2.1	Temperatura de Transición Vítreo (T _g)	120
4.1.2.2	Liofilización	122
4.1.3	MORFOLOGÍA DE LAS PEG-cSLNs SUSPENDIDAS SIN LIOFILIZAR Y LIOFILIZADAS.....	125
4.1.4	ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN	125
4.1.4.1	Filtración de las PEG-cSLNs Liofilizadas	125
4.1.4.2	Agregados de las PEG-cSLN Suspendidas sin Liofilizar y Liofilizadas .	130
4.1.4.3	Estudio de los Parámetros Críticos del Proceso (CPP) de la Liofilización	132
4.1.4.4	Evaluación de Crioprotectores	144
4.1.4.5	Optimización de los Parámetros Críticos del Proceso (CPP) de la Liofilización	149
4.1.5	EFFECTO DE LA CISTAMINA EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LAS PEG-cSLNs.....	151

4.1.5.1	Liofilización de las PEG-cSLN con Cistamina.....	156
4.1.6	ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS PEG-cSLNs	157
4.1.6.1	Estudio de Estabilidad de las PEG-cSLNs Suspendidas sin Liofilizar ...	157
4.1.6.2	Estudio de Estabilidad de las PEG-cSLNs Liofilizadas	161
4.1.6.3	Estudio de Estabilidad de las PEG-cSLNs con Cistamina	165
4.2	SECCIÓN BIOLÓGICA	169
4.2.1	CITOTOXICIDAD DE LAS PEG-cSLNs.....	169
4.2.2	FORMACIÓN DE LOS SLNplejos CON LAS PEG-cSLNs	177
4.2.3	TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK293T CON LAS PEG-cSLNs	179
5.	DISCUSIÓN GENERAL	182
6.	CONCLUSIONES.....	208
7.	BIBLIOGRAFÍA	212
8.	ANEXOS.....	234

ABREVIACIONES

AAV: Virus adeno-asociados
ADA-SCID: Inmunodeficiencia severa combinada debida a deficiencia de adenosina deaminasa
ADN: Ácido desoxirribonucleico
API: Principio activo (*Active Pharmaceutical Ingredient*)
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ASO: Oligonucleótido antisentido
ATP: Adenosin trifosfato
AV: Adenovirus
AVA: Adenovirus atenuados
BSA: Albúmina de suero bovino
CCPs: Parámetros críticos de proceso
COVID-19: Enfermedad por Coronavirus de 2019
CRISPR/CAS9: Clustered interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated system 9
DLBCL: Linfoma de células B grandes difuso
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium
DOTAP: Cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio
DSC: Calorimetría diferencial de barrido
ECHA: Agencia Europea de productos químicos
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
ELA: Esclerosis lateral amiotrófica
EMA: Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency*)
FBS: SÉRUM bovino fetal
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (*Food and drug administration*)
HLB: Balance hidrófilo-lipofílico
iARN: ARN de interferencia
LAR-II: Luciferase assay reagent II
LDV: Velocimetría por láser Doppler
LF: linfoma células B folicular.
LLA: Leucemia linfoblástica aguda
LNP: Nanopartículas lipídicas
LUC: Luciferasa
LV: Lentivirus
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
miARN: micro ARN
MLD: Metacromasia cerebral
NLC: Portadores lipídicos nanoestructurados

NMs: Nanomateriales
NPs: Nanopartículas
PBS: Tampón fosfato salino
Pdl: Índice de polidispersidad
PEG: Polietilenglicol
PI: Ioduro de propidio
PSD: Distribución del tamaño de partículas
QbD: Quality by design
RV: Retrovirus
SCD: Anemia de células falciformes
sgARN: ARN de guía única
siARN: ARN pequeño de interferencia
SLNs: Nanopartículas sólidas lipídicas
SMA: Atrofia muscular espinal
SMaRT: Trans-empalme de ARN mediado por empalmosoma
TALENs: Nucleasas de actividad similar al activador de transcripción
Tc: Temperatura de colapso
TEM: Microscopía electrónica de transmisión
Teu: Temperatura eutéctica
Tg: Temperatura de transición vítrea
TG: Terapia génica
VHS: Virus del herpes simple
VIH: Virus de inmunodeficiencia humana
VNV: Vectores no virales
VOCs: Crisis vaso-oclusivas
VV: Vectores virales
ZFNs: Nucleasas con dedos de zinc
ZP: Potencial zeta

**PARTE
BIBLIOGRÁFICA**

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENFOQUES INNOVADORES EN FARMACIA GALÉNICA: DESAFÍOS Y OPORTUNIDADES EN TERAPIA GÉNICA Y TERAPIAS DE ADN/ARN

Durante los últimos treinta años, los avances en el campo de la nanotecnología han revolucionado la terapia génica (TG) y las estrategias terapéuticas basadas en la tecnología del ADN/ARN, estableciéndose como elementos fundamentales de este campo emergente en la medicina. La TG tiene como objetivo corregir o tratar enfermedades genéticas, crónicas o hereditarias mediante la introducción de material genético, la modificación de la expresión génica o el silenciamiento de genes específicos en las células del paciente, con el fin de restaurar o mejorar su función biológica. Este proceso se lleva a cabo con la administración de ácidos nucleicos, como ADN o ARN. Mientras que el ADN terapéutico se introduce en las células para corregir mutaciones genéticas, el ARN terapéutico se utiliza para interferir con la expresión de genes específicos o para reemplazar proteínas deficientes (1,2).

Esta metodología implica la transferencia, silenciamiento o adición de genes con fines terapéuticos, basada en la capacidad de un transgén (gen exógeno) para modificar la biología y el fenotipo de las células, tejidos y órganos diana (3). Requiere tres componentes esenciales: un gen de interés, que constituye el material genético a transferir y se espera que, al expresarse en una célula normal, tenga un efecto terapéutico; la célula diana, sobre la cual se realizará la modificación; y el vector, que actúa como vehículo para transportar el material genético y permitir su introducción en la célula diana (Figura 1) (1).

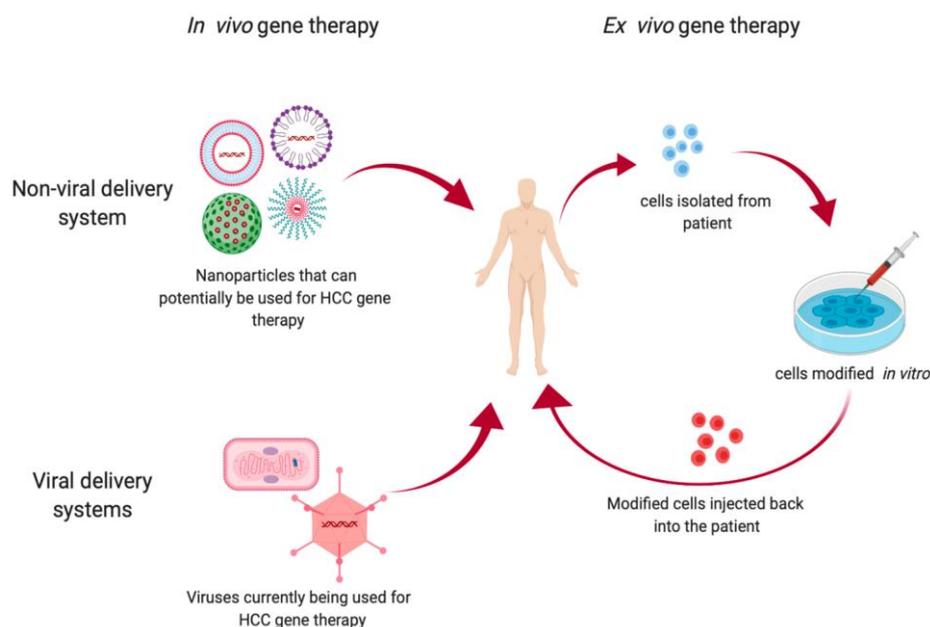


Figura 1. Descripción general de los tipos de técnicas de terapia génica comúnmente utilizadas (201).

1.1.1 ANTECEDENTES DE LA TERAPIA GÉNICA

El concepto de terapia génica emergió a finales de la década de 1970, coincidiendo con el acelerado avance de la tecnología del ADN recombinante. Esta tecnología ha permitido manipular el genoma de cualquier organismo, al cortar y unir secuencias de ADN con el propósito de explorar sus potenciales aplicaciones terapéuticas y comerciales, revolucionando así la práctica de la biología molecular y promoviendo el desarrollo de nuevos métodos de diagnósticos, como la transferencia de la información genética (4). No obstante, durante las décadas de los ochenta y noventa, hubo varios intentos y fracasos al tratar pacientes empleando terapia génica. No fue hasta 2012 que en Europa se aprobó la primera terapia génica. La compañía farmacéutica alemana UniQure fue pionera en este avance al lanzar al mercado su propia terapia llamada Glybera para tratar la deficiencia de lipoproteína lipasa hereditaria. A pesar de ello, su permanencia en el mercado duró solo unos años y fue retirado en 2017 debido a su elevado costo y al limitado número de pacientes que podían beneficiarse de ella (3).

En 2016, GlaxoSmithKline desarrolló una terapia génica para tratar a pacientes con déficit de adenosina desaminasa (ADA). En 2017, Estados Unidos aprobó su primera terapia génica basada en células CAR-T (terapias basadas en la modificación de linfocitos) para tratar la leucemia linfoblástica. En 2020, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) finalizó seis directrices sobre terapia génica, que incluían un borrador de pautas para la investigación y el desarrollo clínico de estas terapias (5). Desde entonces, la eficacia y seguridad de las terapias génicas han mejorado considerablemente, impulsando la aprobación de nuevos ensayos clínicos tratar enfermedades como la adrenoleucodistrofia, la hemofilia A, la β -talasemia y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (3).

1.1.2 ACTUALIDAD DE LAS TERAPIAS GÉNICAS

Hoy en día, diversas terapias génicas han sido aprobadas en todo el mundo, dirigidas a tratar una amplia gama de tipos de cáncer y algunas enfermedades metabólicas. El incremento notable en el número de ensayos clínicos aprobados para terapia génica ha contribuido considerablemente a reforzar su seguridad (2). Varios países han liderado el desarrollo y la aprobación de medicamentos para terapia génica (Figura 2). Entre ellos resaltan:

- **Estados Unidos:** Se destaca por su liderazgo en el desarrollo y la aprobación de terapias génicas. La FDA ha aprobado varios medicamentos para este fin. El primer

ensayo clínico en terapia génica tuvo lugar en los EE. UU. en 1990, cuando se trató a una niña con una deficiencia de ADA (6).

- **Europa (especialmente Alemania, Reino Unido, Francia, Suiza, Países Bajos):** Alemania ha sido pionero en este campo y ha mantenido su liderazgo durante las últimas dos décadas, con aproximadamente 9000 solicitudes de patentes. Los demás países europeos también han estado activamente involucrados en la investigación, desarrollo y aprobación de medicamentos para terapia génica (7). La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ha dado luz verde a varios medicamentos para este propósito.
- **China:** Ha experimentado un crecimiento acelerado y ha surgido como un actor importante en el campo de la terapia génica en los últimos años. China ha aprobado varias terapias génicas y está llevando a cabo investigaciones significativas en este ámbito. En 2003, se aprobó en China la primera terapia génica comercial para tratar el cáncer de cabeza y cuello (8).
- **Japón:** Ha participado activamente en la investigación y desarrollo de terapias génicas, y ha aprobado medicamentos como Zolgensma y Luxturna. En 2019, Japón aprobó la primera terapia génica para tratar la distrofia muscular de Duchenne bajo el nombre de Elevidys (9).



Figura 2. Panorama general del mercado de la terapia génica (202).

Estos países han establecido regulaciones claras y procesos de aprobación para la terapia génica, lo que les ha permitido liderar en la implementación de estas innovadoras formas de tratamiento. Según la FDA, la terapia génica se define como “una técnica que modifica los genes de una persona para tratar o curar una enfermedad, con el objetivo de modificar o manipular la expresión de un gen o alterar las propiedades biológicas de células vivas para uso terapéutico” (7). El progreso en este campo se respalda en la biología molecular, que facilita la producción de ácidos nucleicos en cantidades considerables. Este enfoque innovador tiene el potencial de tratar una amplia variedad de enfermedades, incluyendo trastornos genéticos raros, enfermedades hereditarias, neurodegenerativas, cardiovasculares y cáncer (enfermedad adquirida). Además, puede emplearse como medida preventiva, como lo demuestra el desarrollo de vacunas contra la COVID-19 (3).

A continuación, se detallan algunas de las enfermedades que pueden ser tratadas con terapia génica (10):

- **Enfermedades monogénicas:** Tratamiento de enfermedades causadas por una sola mutación genética, como fibrosis quística, hemofilia y distrofia muscular.
- **Cáncer:** Desarrollo de terapias dirigidas que inhiben genes oncogénicos o estimulan genes supresores de tumores.
- **Enfermedades cardiovasculares:** Introducción de genes que promueven la angiogénesis para tratar la enfermedad arterial coronaria.
- **Enfermedades neurodegenerativas:** Investigación en curso para desarrollar terapias génicas para enfermedades como Alzheimer, Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Además, se han aprobado varios medicamentos para terapia génica por la FDA y la EMA (Tabla 1):

- **Spinraza (nusinersén):** Es el primer medicamento aprobado para el tratamiento de la atrofia muscular espinal (SMA), una enfermedad genética poco común que afecta a las neuronas motoras en la médula espinal. Esta terapia actúa sobre el ARN mensajero (ARNm) del gen *SMN2*, con el fin de aumentar la producción de proteína SMN (*survival motor neuron*) funcional en las células afectadas de la médula espinal. Está dirigido tanto a pacientes pediátricos como adultos, incluyendo recién nacidos. Se administra mediante inyección intratecal (11,12).
- **Kymriah (tisagenlecleucel):** Aprobada para el tratamiento de ciertos tipos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) y linfoma células B folicular (LF). Pacientes

pediátricos y adultos jóvenes de hasta 25 años con LLA y adultos con LF. Fue la primera terapia génica aprobada en EE. UU. (13–16).

- **Yescarta (axicabtagene ciloleucel):** Aprobada para el tratamiento de ciertos tipos de linfoma de células B grandes difuso (DLBCL) (17,18).
- **Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl):** Aprobada para el tratamiento de la distrofia retiniana hereditaria asociada a mutaciones bialélicas en el gen *RPE65* (19,20).
- **Zolgensma (onasemnogene abeparvovec-xioi):** Aprobada para el tratamiento de la atrofia muscular espinal (SMA) en bebés y niños menores de dos años (21,22).
- **Strimvelis (gammaretrovirus transducción):** Aprobado para el tratamiento de la inmunodeficiencia combinada grave (SCID) debido a la deficiencia de adenosina desaminasa (ADA-SCID). Strimvelis es una terapia génica *ex vivo* que modifica las células madre hematopoyéticas del paciente para corregir la deficiencia de ADA, previamente transfectadas en el laboratorio por un vector viral. Se convierte en la primera terapia génica aprobada en Europa para una enfermedad rara (23).
- **Zynteglo (betibeglogene autotemcel):** Aprobado para la β -talasemia transfusional en pacientes que no son elegibles para un trasplante de células madre hematopoyéticas. La β -globina funcional reemplaza la β -globina deficiente en pacientes con β -talasemia, lo que ayuda a restaurar la función de los glóbulos rojos y reduce la necesidad de transfusiones sanguíneas (24,25).
- **Libmeldy (atidarsagene autotemcel):** Aprobado para la metacromasia cerebral (MLD) o leucodistrofia metacromática. Terapia génica para corregir la función de las células nerviosas en pacientes con MLD al introducir una copia funcional del gen *arylsulfatase A (ARSA)* (26,27).
- **Lyfgenia:** Aprobada para tratar la anemia de células falciformes (SCD) en pacientes mayores de 12 años con anemia de células falciformes y antecedentes de crisis vaso-oclusivas (VOCs) (28,29).

1.1.3 HERRAMIENTAS PARA TERAPIA GÉNICA

Este apartado detalla las características, mecanismos de acción, ventajas y desventajas de algunos de los sistemas moleculares empleados en terapia génica.

1.1.3.1 Nucleasas con Dedos de Zinc (ZFNs)

Las nucleasas de dedos de zinc (ZFNs) son enzimas de restricción diseñadas para reconocer y realizar cortes específicos en el ADN. Este sistema se compone de un dominio de unión a secuencias de ADN específicas (zinc-finger) y una endonucleasa

Tabla 1. Medicamentos aprobados por la FDA y la EMA para terapia génica.

Medicamento	Año	Agencias Reguladoras	Tipo de Terapia	Farmacéutica	Costo
Spinraza (nusinersén)	2016	FDA	Oligonucleótido antisentido.	Biogen	\$750000
Kymriah (tisagenlecleucel)	2017	FDA	Células T autólogas modificadas genéticamente.	Novartis	\$475000
Yescarta (axicabtagene ciloleucel)	2017	FDA	Células T autólogas modificadas genéticamente.	Kite Pharma, Inc (Gilead Sciences)	Depende de la región. Precio max. fijado €327000
Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl)	2017	FDA	Vector viral adenoasociado (AAV2).	Kite Pharma, Inc (Gilead Sciences)	\$850000
Zolgensma (onasemnogene abeparvovec-xioi)	2019	FDA	Virus adenoasociado (AAV9) modificado genéticamente (Onasemnogén abeparvovec).	Novartis	\$850000
Strimvelis (gammaretrovirus transducción)	2019	EMA	Virus adenoasociado (AAV9) modificado genéticamente (Onasemnogén abeparvovec).	Novartis	\$850000
Zynteglo (betibeglogene autotemcel)	2022	EMA	Células del paciente modificadas genéticamente.	Bluebird bio, Inc.	\$850000
Libmeldy (atidarsagene autotemcel)	2020 2021	EMA UK	Células del paciente modificadas genéticamente.	Orchard Therapeutics	£2.8M
Lyfgenia	2023	FDA	Vector lentiviral.	Bluebird bio, Inc.	\$3.1M
Casgevy	2024	FDA	CRISPR/Cas9.	Vertex Pharmaceuticals	\$2.2M

que efectúa el corte en sitios específicos. Permiten la edición del genoma, incluyendo la corrección de mutaciones, la inserción de genes nuevos y la eliminación de genes no deseados. Las ZFNs pueden generar roturas de doble cadena en ubicaciones específicas del ADN, las cuales son reparadas por vías celulares como la recombinación homóloga o la unión de extremos no homólogos. Entre sus ventajas se resaltan su alta especificidad para secuencias de ADN diana, la capacidad de modificar genes en su ubicación precisa y su éxito en estudios preclínicos y clínicos. Sin embargo, su diseño y construcción son complejos, pueden presentar efectos fuera del objetivo y son menos eficientes que tecnologías más recientes como CRISPR-Cas9 (30,31).

1.1.3.2 Nucleasas de Actividad Similar al Activador de Transcripción (TALENs)

Los TALENs también tienen la capacidad de reconocer secuencias específicas de ADN, utilizando proteínas derivadas de bacterias *Xanthomonas*. Representan una clase adicional de nucleasas de dedos de zinc diseñadas para la edición génica. Estos sistemas utilizan proteínas TAL (*Transcription Activator-Like*) para unirse al ADN y generar roturas de doble cadena, de manera similar a los ZFNs. Las células reparan estas roturas a través de procesos como la recombinación homóloga o la unión de extremos no homólogos. Sin embargo, aún requieren un diseño y construcción complejos, lo que podría resultar en posibles efectos no deseados, requiriendo un enfoque personalizado para cada objetivo. Aunque se distinguen por su mayor flexibilidad en el diseño de reconocimiento de secuencias de unión al ADN que los ZFNs, lo que se traduce en menos efectos fuera del objetivo, son menos utilizados que otras tecnologías de edición genética como CRISPR-Cas9 (32,33).

1.1.3.3 Trans-Empalme de ARN Mediado por Empalmosoma (SMaRT)

La técnica SMaRT permite reemplazar o corregir segmentos específicos de ARNm, siendo especialmente útil para tratar enfermedades causadas por mutaciones en el empalme (*splicing*) del ARNm. Consiste en el uso de compuestos pequeños diseñados para unirse a ARN específicos y modular su función, ya sea alterando su traducción o su estructura. Esta técnica aprovecha el proceso molecular del empalme del ARNm para fusionar segmentos defectuosos con segmentos correctos, logrando así corregir mutaciones. Al unirse selectivamente a secuencias de ARN objetivo, estos compuestos interfieren con su función. Entre sus ventajas se resaltan su precisión en la corrección de mutaciones del empalme del ARNm, evitando provocar efectos no deseados, su potencial para regular la expresión génica de manera precisa y un menor riesgo de activación inmunológica en comparación con otras terapias génicas. Sin embargo,

presenta algunas limitaciones, como la necesidad de un diseño específico para cada mutación y una eficacia variable dependiendo de la ubicación de la mutación (34,35).

1.1.3.4 Sistema CRISPR-Cas9

El surgimiento y desarrollo de CRISPR-Cas9 ha posicionado a la terapia génica como uno de los avances científicos más prometedores de la última década, transformando la forma en que los investigadores pueden modificar el ADN con precisión y eficacia. Esta herramienta ha facilitado la edición altamente específica de genes de manera más económica y rápida que los métodos desarrollados previamente. Su origen se remonta al descubrimiento en 1987 de un peculiar patrón repetido en el ADN bacteriano. Posteriormente, en los 2000, se acuñó el término "CRISPR" (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) para referirse a estas regiones. Estas secuencias de ADN contienen fragmentos repetidos intercalados con "espaciadores" derivados de virus que previamente infectaron a la bacteria, funcionando esencialmente como un sistema inmunológico adaptativo en arqueas y procariontes. Este mecanismo biológico les brinda protección contra la infección de bacteriófagos y plásmidos exógenos. En conjunto con la enzima Cas9 (*Streptococcus pyogenes*), que se une a este sistema, CRISPR-Cas9 es capaz de cortar el ADN en ubicaciones específicas y puede ser programado para dirigirse a secuencias genéticas específicas mediante un ARN guía (sgARN) (Figura 3). Esta tecnología ha sido exitosamente adaptada para la edición de genes humanos (36).

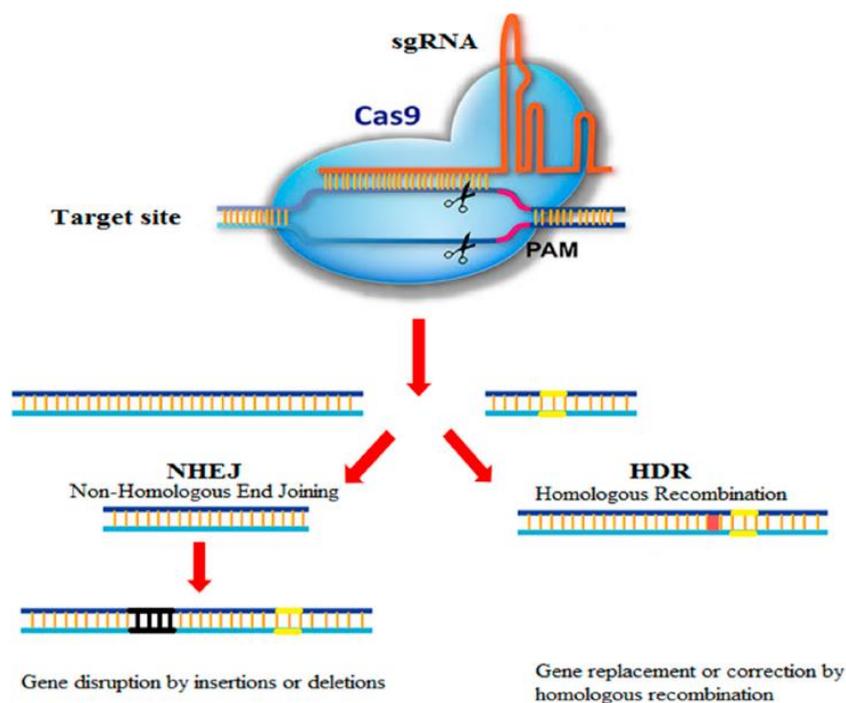


Figura 3. Esquema del sistema CRISPR-Cas9 en la edición génica (203).

El sistema CRISPR-Cas9 no solo posibilita el corte e inactivación de genes, sino que también permite su edición y reparación de manera sencilla, efectiva y específica, corrigiendo mutaciones o insertando nuevos fragmentos de ADN con gran precisión. Esta capacidad de modularidad y programabilidad inherentes a los sistemas CRISPR ha dado lugar a la implementación de un conjunto de tecnologías moleculares de ARN guía sintéticos, convirtiéndose en una herramienta relevante para la edición de genes y potenciales tratamientos para terapias génicas (37). En la actualidad, se han descrito sistemas CRISPR clasificados como sistemas inmunológicos adaptativos microbianos guiados por ARN, que muestran diversas arquitecturas y mecanismos, divididos en 6 tipos y 33 subtipos. Sin embargo, el rápido crecimiento de las bases de datos de secuencias dificulta la búsqueda de nuevos sistemas. Para abordar este desafío, se han desarrollado herramientas bioinformáticas basadas en algoritmos de agrupamiento que son de gran utilidad para el análisis rápido de millones de secuencias. Gracias a su aplicación, se han identificado 188 módulos genéticos vinculados a CRISPR, lo que revela la existencia de numerosas funciones bioquímicas adicionales asociadas a la inmunidad adaptativa (36).

Entre sus ventajas, recalcan su alta especificidad y eficiencia, así como su relativa facilidad de diseño y aplicación en comparación con otras tecnologías de edición genética. No obstante, presenta desafíos técnicos como la optimización de entrega y la minimización de posibles efectos fuera del objetivo (*off-target*), además de sus implicaciones éticas y regulatorias sobre su aplicación segura y efectiva en humanos. Sin embargo, se están logrando avances significativos para superar estos obstáculos. Un ejemplo reciente es la aprobación del primer medicamento basado en esta tecnología en el año 2023, denominado Casgevy, para el tratamiento de enfermedades genéticas como la anemia falciforme y la β -talasemia (38,39). A medida que la tecnología continúa avanzando, se espera que tenga un impacto significativo en la medicina, la agricultura y otros campos relacionados con la biotecnología en las próximas décadas (36).

1.1.3.5 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN extracromosómico de doble cadena, cuyo tamaño puede variar desde unos pocos miles hasta cientos de miles de pares de bases (Figura 4). Se encuentran principalmente en procariotas (bacterias y arqueas) y en levaduras en el caso de células eucariotas. Además, se ha observado la presencia de plásmidos inactivos en mitocondrias y cloroplastos, organelos de origen bacteriano.

Pueden ser endógenos, es decir, estar naturalmente presentes en la célula huésped, o ser introducidos artificialmente mediante técnicas de ingeniería genética (40).

Los plásmidos tienen la capacidad de replicarse de manera autónoma dentro de la célula huésped debido a que poseen su propio origen de replicación (ori). Utilizan la maquinaria de replicación celular de la célula huésped para replicarse durante la división celular. Esta capacidad de replicación les permite ser transmitidos a la descendencia durante la división celular, lo que los convierte en sistemas útiles para integrar material genético, como genes terapéuticos, en su estructura y expresar genes exógenos en varios sistemas celulares (41).

Los plásmidos tienen la versatilidad de ser modificados para introducir nueva información genética o eliminar genes no deseados. Contienen una variedad de genes, que abarcan desde aquellos que confieren resistencia a antibióticos, participan en el metabolismo de nutrientes, la producción de toxinas o enzimas, hasta genes involucrados en la conjugación o transferencia horizontal de genes entre bacterias de la misma especie o incluso entre especies diferentes. En el ámbito de la biotecnología y la terapia génica, los plásmidos se utilizan como vectores de expresión para la introducción de genes específicos en células huésped, tanto con fines de investigación como terapéuticos (42).

Para asegurar su correcto funcionamiento, un plásmido debe poseer ciertas partes esenciales (43,44) que son:

- **Origen de replicación (ori):** Es una secuencia de ADN que permite la replicación autónoma del plásmido dentro de la célula huésped. Sin un ori funcional, el plásmido no puede replicarse y se perderá durante las divisiones celulares.
- **Sitio de clonación:** Es una región del plásmido donde se inserta el gen terapéutico o la secuencia de interés. Esto permite la expresión del gen dentro de la célula huésped, lo cual facilita que se produzca el efecto terapéutico deseado.
- **Promotor:** Es una secuencia de ADN que controla la transcripción del gen insertado. El promotor dirige la actividad de la ARN polimerasa, que a su vez sintetiza el ARNm a partir del gen insertado.
- **Señal de terminación:** Es una secuencia de ADN que marca el final de la transcripción del gen insertado. Ayuda a asegurar una síntesis adecuada del ARNm y evita la producción de transcripciones adicionales más allá del gen terapéutico.
- **Elementos de selección:** Son secuencias de ADN que confieren resistencia a antibióticos u otros agentes de selección. Estos elementos permiten identificar y

seleccionar células que han tomado el plásmido, ya que solo las células que lo contienen sobrevivirán en presencia del agente de selección.

- **Marcador de selección:** Es un gen insertado en el plásmido que codifica una proteína que confiere resistencia a un antibiótico específico. Este marcador de selección se utiliza para identificar células que han adquirido el plásmido y para mantener la presión selectiva durante el cultivo celular.

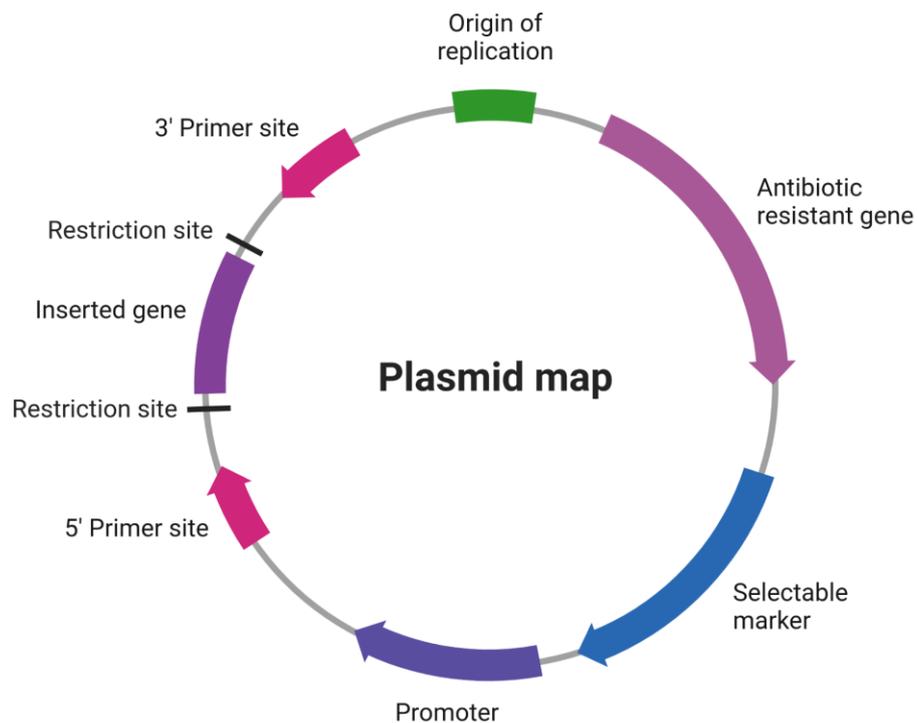


Figura 4. Estructura general de un plásmido (204).

1.1.3.6 Secuencias Cortas de ARN no Codificante

Además de los plásmidos, que transportan material genético en forma de ADN, también es posible vehicular secuencias cortas de ARN no codificante, cuyas funciones están relacionadas con la regulación génica y la traducción de proteínas. Entre estas tecnologías se encuentran los oligonucleótidos antisentido (ASOs), capaces de silenciar genes al interferir con la traducción de proteínas y afectar el ensamblaje del ARNm. Estos oligonucleótidos son pequeñas secuencias que se unen específicamente con ARNm mutado o defectuoso, alterando el splicing alternativo y reduciendo la producción de proteínas anormales asociadas a enfermedades (45). Otra tecnología utilizada son los ARN de interferencia (iARN), los cuales reducen la expresión de genes específicos al unirse con ARNm y activar la enzima ARNasa, encargada de degradar el ARNm, evitando así su traducción en proteínas (46).

No obstante, una de las tecnologías más recientes basadas en ARN son los ARN pequeños de interferencia (siARN). Estas moléculas cortas de ARN de doble cadena, compuestas por 21–23 pares de bases con dos bases fosforiladas, se generan a partir de precursores de ARN de doble cadena. A pesar de ser inestables y propensos a la degradación en el organismo, los siARN presentan potencial terapéutico. Sin embargo, para su aplicación, es necesario protegerlos y facilitar su captación por la célula diana, ya que son lo bastante pequeños para ser eliminados a través del riñón, pero demasiado grandes para atravesar las membranas celulares (47,48).

Una vez en el citoplasma, el mecanismo de acción de los siARN se basa en su secuencia complementaria al ARNm diana. Se unen al complejo enzimático RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN), con actividad similar a la helicasa, que separa las dos hebras del siARN manteniendo la hebra antisentido o guía. Posteriormente, el complejo RISC identifica los ARNm que poseen la secuencia complementaria, lo que conlleva a su corte y la posterior inhibición de la traducción o su degradación, reduciendo así la expresión del gen correspondiente (Figura 5) (49).

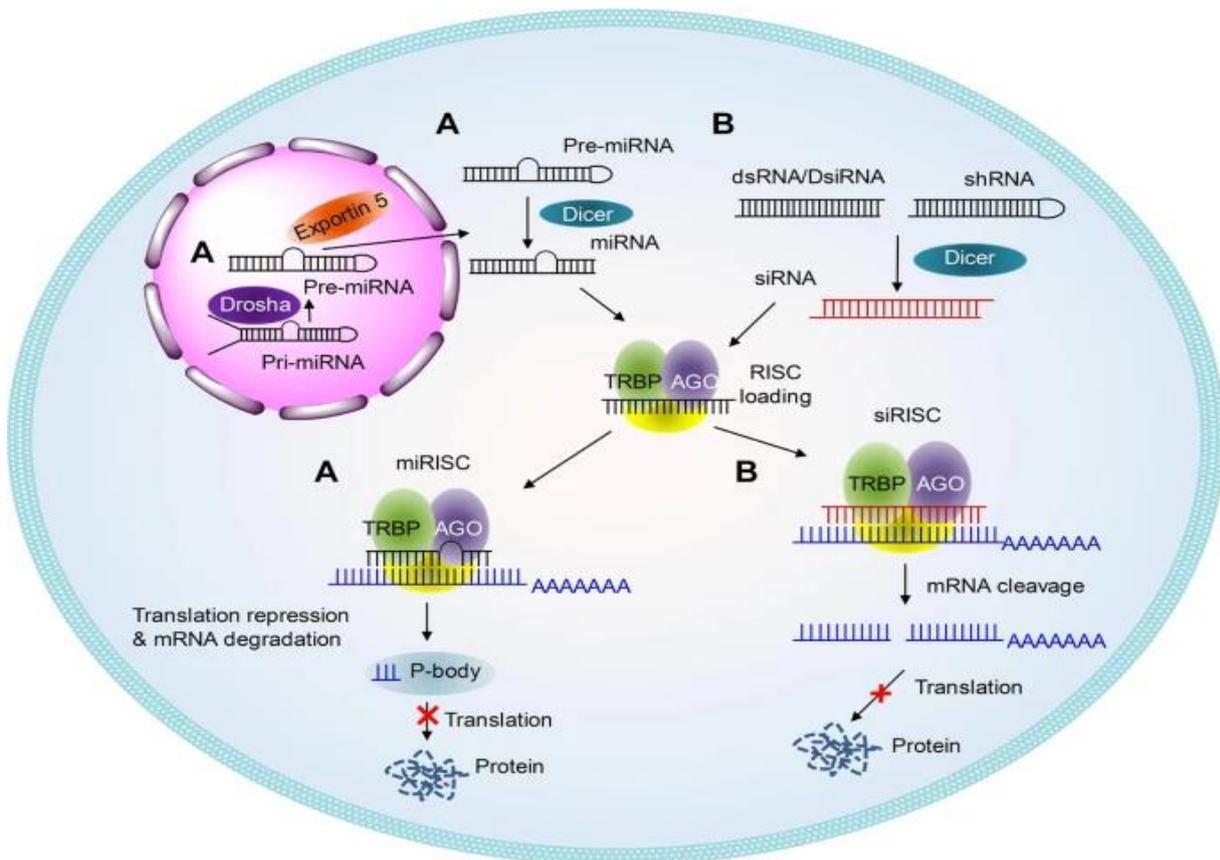


Figura 5. Ilustraciones esquemáticas de los mecanismos de funcionamiento de miARN (A) y siARN (B) (205).

Sin embargo, el uso de siARN enfrenta desafíos potenciales, como la posibilidad de suprimir genes no deseados debido a posibles similitudes entre el ARNm diana y otros ácidos nucleicos. Además, los siARN pueden activar receptores inmunológicos, desencadenando la liberación de citoquinas y alterando la expresión de genes (49). Para contrarrestar estos efectos, se han desarrollado vectores no virales capaces de encapsular y proteger el material genético, evitando interferencias no deseadas en la secuencia genética.

1.1.4 APLICACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DE LA TERAPIA GÉNICA

Se están realizando avances importantes en las tecnologías de entrega de genes con el fin de mejorar tanto la eficacia como la seguridad de la terapia génica. Estos avances incluyen el desarrollo de terapias génicas personalizadas, adaptadas al perfil genético único de cada paciente, lo que abre nuevas posibilidades en el tratamiento de diversas enfermedades. Además, la investigación continua se centra en abordar los desafíos técnicos y éticos que surgen en el campo de la terapia génica, lo que promete lograr avances aún más significativos en el futuro. La capacidad actual para secuenciar cientos de miles de genomas, analizar la expresión genética a nivel unicelular y manipular genes con nucleasas programables desempeña un papel crucial en el descubrimiento de nuevos objetivos para las terapias genéticas (50).

Adicionalmente, la inteligencia artificial está desempeñando un papel cada vez más importante. Herramientas informáticas como AlphaMissense, que predice la estructura de las proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos, están revolucionando el diagnóstico al evaluar la probabilidad de que cada cambio de aminoácido en el genoma pueda ser la causa de una enfermedad (51). Geneformer, por otro lado, analiza las interacciones entre genes para identificar posibles dianas terapéuticas y estimar qué alteraciones genéticas podrían derivar en enfermedad a partir de los datos obtenidos de las interacciones (52). ClinPrior, mejora la tasa de diagnóstico en pacientes con enfermedades raras de origen genético (52). Por último, FLSHclust es una herramienta bioinformática de interés para el análisis rápido de millones de secuencias, mostrando la diversidad de sistemas CRISPR y ofreciendo un potencial significativo para el desarrollo o perfeccionamiento de aplicaciones biotecnológicas y médicas (36).

1.1.5 POTENCIALES RIESGOS Y LIMITACIONES DE LA TERAPIA GÉNICA

El riesgo asociado a la terapia génica varía dependiendo del tipo de tratamiento y el método de administración. Entre los riesgos potenciales se encuentra la posibilidad de

desencadenar una reacción inmunitaria, que podría afectar tanto al sistema de administración de la TG como a la proteína terapéutica, disminuyendo así la eficacia del tratamiento. Además, existe el riesgo de mutagénesis de inserción, especialmente cuando se utilizan vectores virales, que pueden insertar el transgén en ubicaciones no deseadas en el genoma del huésped, lo que podría desencadenar una división celular descontrolada u oncogénesis de inserción y el desarrollo de cáncer (53). También se presenta el riesgo de inactivación involuntaria de otros genes con funciones importantes durante el proceso de terapia génica. Es relevante señalar que los enfoques actuales en terapia génica se ven limitados por su alto costo y su reducida disponibilidad, lo que restringe su alcance potencial y su desarrollo continuo (2).

Es fundamental reconocer que la terapia génica y las terapias basadas en tecnologías de ADN/ARN representan áreas sumamente prometedoras en la medicina, aunque también presentan desafíos únicos para la farmacia galénica. La resolución de estos problemas representa el próximo gran desafío en la investigación y aplicación de la terapia génica, así como en el abordaje de otras enfermedades importantes. Uno de los principales obstáculos para la implementación clínica de los tratamientos genéticos radica en la eficacia de la administración intracelular a los tejidos diana *in vivo*. A pesar de estos retos, se ha observado un aumento en la investigación y desarrollo dirigido a superar estas barreras y aprovechar al máximo el potencial terapéutico de estas innovadoras estrategias de tratamiento (54,55).

Hasta el año 2022, la FDA ha recibido aproximadamente 900 solicitudes para investigar estrategias de terapia génica en ensayos clínicos, pero sólo se han aprobado diez productos por la FDA (56,57). Por otro lado, la EMA ha otorgado la aprobación comercial a ocho productos para terapia génica destinados al tratamiento de diferentes enfermedades (58). Sin embargo, la aplicación de estas terapias enfrenta desafíos importantes como las barreras anatómicas y la necesidad de diseñar vectores eficientes que permitan una expresión génica adecuada sin ocasionar efectos secundarios adversos, como inflamación o toxicidad (54).

Entre los desafíos más destacados se encuentran el desarrollo de vectores de administración de genes dirigidos a tejidos específicos, la protección del transgén contra la degradación por nucleasas, su transporte eficiente al núcleo de las células diana y su producción en cantidades significativas (59). En consecuencia, la farmacia galénica, en conjunto con los avances en terapias basadas en la tecnología del ADN/ARN, se enfrenta a nuevos retos y oportunidades (60), los cuales incluyen:

- **Desarrollo de sistemas de entrega (vectores) eficientes:** Se requieren sistemas especializados para garantizar la entrega selectiva de ácidos nucleicos terapéuticos a las células diana, protegiéndolos de la degradación y asegurando su liberación segura.
- **Optimización de la estabilidad y eficacia:** Es crucial mejorar la estabilidad de los ácidos nucleicos terapéuticos durante el almacenamiento y la administración, así como su capacidad para llegar a las células diana y ejercer su efecto terapéutico para lograr eficacia clínica.
- **Minimización de la toxicidad y la inmunogenicidad:** Busca reducir las respuestas inmunitarias no deseadas y los efectos tóxicos asociados con la entrega de ácidos nucleicos terapéuticos mediante la optimización de formulaciones y dosis.
- **Mejora de la biodistribución y la farmacocinética:** Se enfoca en diseñar sistemas de entrega que mejoren la distribución y estabilidad de los ácidos nucleicos en el cuerpo, aumentando su eficacia terapéutica y tiempo de circulación.
- **Regulación y ética:** Consideraciones éticas sobre la modificación genética y la regulación de los tratamientos de terapia génica.

Uno de los principales desafíos en la terapia génica y las terapias basadas en ARN radica en la administración *in vivo* del material genético. Tanto el ADN como el ARN son altamente inestables cuando circulan libremente en el torrente sanguíneo debido a la rápida degradación por exonucleasas presentes en el organismo humano. Además, el ADN desnudo enfrenta dificultades para penetrar en las células debido a su naturaleza hidrofóbica y apolar (61). Por lo tanto, es esencial utilizar vectores que protejan y entreguen eficazmente el ADN o ARN a las células diana.

1.2 VECTORES VIRALES (VV)

En la terapia génica actual, se emplean dos tipos de tecnologías en los sistemas de entrega de material genético a nivel nanométrico: vectores virales (VV) y no virales (VNV), cada uno con ventajas y limitaciones específicas (62). Los VV, genéticamente modificados a partir de virus, pueden ser tanto integrativos como no integrativos, cuya finalidad es transportar e insertar genes terapéuticos en las células del paciente para lograr una expresión estable y eficiente del transgén, minimizando los efectos adversos. A pesar de su alta eficacia en la transfección *in vivo*, pues consigue transducir el 95–100% de las células (63), su inmunogenicidad y citotoxicidad son consideraciones importantes. Asimismo, estos vectores tienen limitaciones en cuanto al tamaño del ADN o ARN que pueden transportar y su proceso de producción resulta costoso (59).

Entre los vectores virales más comunes se encuentran los adenovirus (AV), retrovirus (RV), lentivirus (LV), virus herpes simple (VHS) y virus adeno-asociados (AAV) (Figura 6). La elección del vector viral adecuado depende del uso previsto y la eficiencia requerida en la expresión del transgén. Aunque los adenovirus exhiben una alta eficiencia de transfección, también presentan desventajas como una marcada inmunogenicidad, mutagénesis de inserción (64), limitaciones en el tamaño del ADN a incorporar y efectos inespecíficos (65,66). Por otro lado, los VNV utilizan sistemas de entrega basados en lípidos, polímeros o nanopartículas (NPs) para transportar los genes terapéuticos a las células, un aspecto que se detallará en la sección 1.3. (Tabla 2).

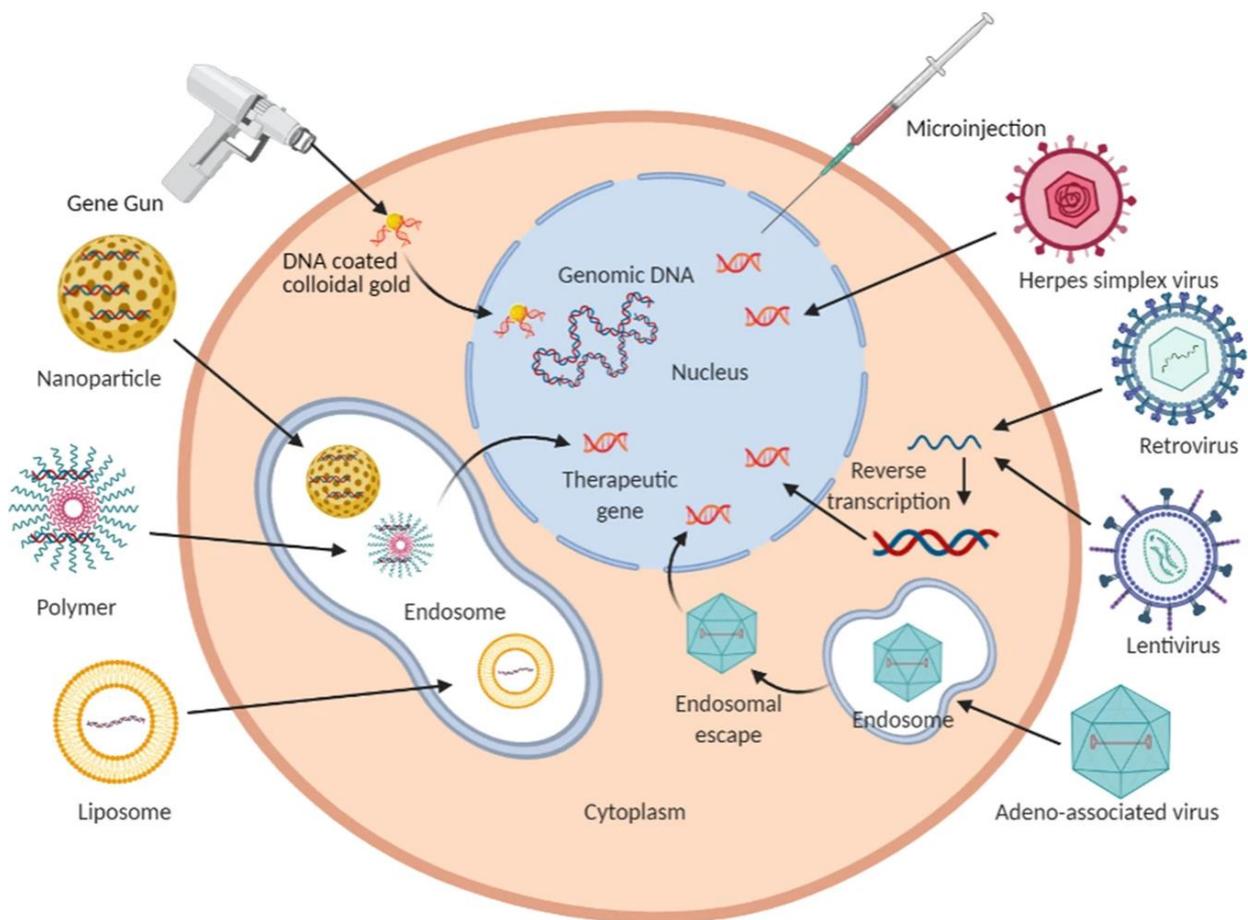


Figura 6. Esquema de entrega de vectores virales y no virales comúnmente utilizados para terapia génica (206).

Tabla 2. Vectores virales principales y sus características correspondientes.

Vectores Virales	Características	Modo de Acción
Gammaretrovirus (67)	Familia Retroviridae. Virus ARN monocatenario positivo (ssARN). Derivados del retrovirus de la Leucemia Murina (MLV). Genoma de 9–11 kb.	Integración en el genoma de la célula diana. Expresión estable y permanente del gen de interés.
Lentivirus (68)	Subgrupo de la familia Retroviridae. Incluyen el VIH y otros. Virus ARN monocatenario positivo (ssARN). Genoma de aproximadamente 8 kb.	Integración en el genoma de la célula diana. Mayor capacidad de carga de genes (hasta 9 kb). Infecta células en división y no división.
Adenovirus (69)	Virus ADN de doble cadena no envueltos. Genoma de 36 kb.	No integración en el genoma de la célula diana. Expresión episomal del gen de interés. Capacidad para infectar células en división y no división mediante el receptor de membrana CAR.
Herpesvirus (70)	Virus de ADN de gran tamaño. Capacidad para cargar genes más grandes (hasta 30–40 kb). Eficacia en la transfección de neuronas.	Expresión sostenida de genes terapéuticos durante la infección latente.
Virus Adeno-Asociados (AAV) (71)	Requieren coinfección con un virus auxiliar. Capacidad para cargar genes de hasta 4.9 kb.	Capacidad de integración específica en el genoma celular, reduciendo el riesgo de mutagénesis.

1.2.1 ANTECEDENTES DE LOS VV

En 1966, se realizaron los primeros hallazgos que indicaban el potencial de los vectores virales para la transferencia de genes funcionales (59). En la década de 1980 se desarrollaron los primeros vectores retrovirales para su aplicación en terapia génica. Posteriormente, en 1990, los genetistas William French Anderson y Michael Blaese llevaron a cabo el tratamiento de una niña de cuatro años con deficiencia en adenosina desaminasa (ADA). Aunque los resultados fueron positivos, no fueron lo suficientemente confiables ya que la paciente también recibió un fármaco que contenía la proteína ADA normal (3). Para 1992, ya se habían autorizado ensayos clínicos para otras seis terapias génicas. Sin embargo, en 1999, Jesse Gelsinger, un adolescente que padecía una enfermedad hepática ligada al cromosoma X, participó en un estudio de terapia génica dirigido por el Dr. James M. Wilson. Esta enfermedad le impedía metabolizar el amonio, un subproducto del metabolismo de proteínas. Desafortunadamente, Jesse falleció cuatro días después del tratamiento debido a una respuesta inmunitaria violenta al vector derivado de adenovirus utilizado, lo que resultó en un fallo multiorgánico (1).

Tres años más tarde, se registraron casos de niños que desarrollaron leucemia después de participar en ensayos clínicos de terapia génica, causados por la inserción de material genético en zonas del genoma asociadas con el desarrollo de esta enfermedad. Estos incidentes generaron escepticismo sobre la viabilidad de las terapias génicas y desaceleraron su rápido desarrollo (4). No obstante, la terapia génica ha avanzado significativamente en las últimas décadas, y los VV desempeñan un papel crucial en esta área. Cuando se diseñan adecuadamente, los VV pueden ser herramientas potenciales para ensayos clínicos. El proceso de producción de los VV implica la transfección de plásmidos en células de empaquetamiento (*packaging cells*), donde se generan los VV libres de genes inmunogénicos e infectivos (72). A continuación, se detallan las ventajas y desventajas del uso de VV en la terapia génica.

1.2.2 VENTAJAS DE LOS VV

Los VV han surgido como una opción fundamental en la terapia génica, a pesar de los desafíos a los que se enfrentan para desarrollar tratamientos efectivos y seguros. Son uno de los métodos principales de transfección en este campo, sobresaliendo por su alto rendimiento y su versatilidad tanto en tratamientos como en experimentos *in vivo*. Su eficacia de transfección elevada permite la entrega eficiente del gen terapéutico, la transducción de una amplia variedad de células y la modificación específica de células para inducir la expresión de genes terapéuticos. Además, su bioseguridad, baja

toxicidad y selectividad en el tropismo viral los convierten en una opción atractiva, especialmente para abordar enfermedades tanto monogénicas como complejas (59).

Entre sus ventajas resaltan su eficiencia en la transducción, gracias a su capacidad de integrarse en el genoma del huésped y proporcionar una expresión sostenida del gen terapéutico, manteniendo su estabilidad. Los AV son particularmente seguros y eficaces en el transporte de genes de gran tamaño sin necesidad de integración en el genoma del huésped. Su éxito se debe en parte a su asociación natural con enfermedades respiratorias en humanos, lo que facilita su producción en grandes cantidades (53). Por otro lado, los AAV pueden integrarse en el genoma del huésped, permitiendo una expresión prolongada del gen terapéutico durante meses (71).

Además, los VV estimulan la respuesta inmunitaria al inducir la síntesis de antígenos, lo que resulta útil en personas inmunocomprometidas y ofrece protección, especialmente con los AV atenuados. Algunos VV pueden ser diseñados para dirigirse a tejidos específicos mediante promotores tisulares. Su eficiencia de transducción, estabilidad y especificidad, junto con su seguridad, los convierten en una opción comúnmente utilizada en las estrategias de TG aprobadas por la FDA (59). Las primeras terapias génicas que llegan o llegarán al mercado utilizan este tipo de vectores (Figura 7). Sin embargo, para garantizar su seguridad y controlar la toxicidad, es relevante seguir desarrollando procedimientos para la separación, purificación y formulación de vectores, en particular los VV. Estos avances son esenciales para mejorar la eficacia y seguridad de la terapia génica (Tabla 3) (55).

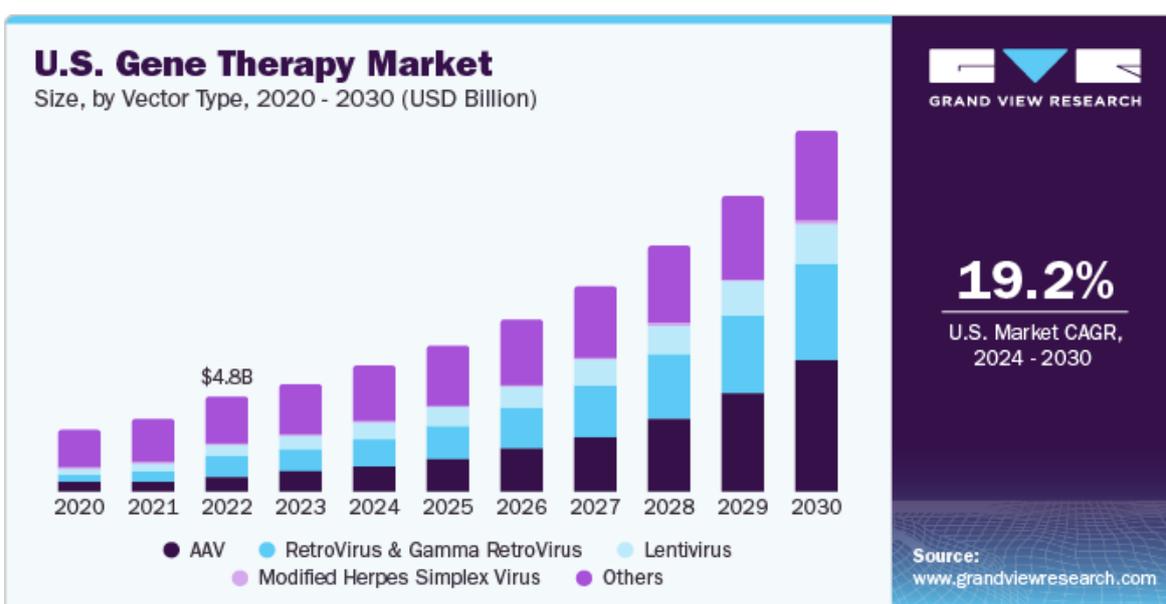


Figura 7. Proyección del Mercado de Terapia Génica en Estados Unidos según el Tipo de Vector (202).

Tabla 3. Vectores virales principales y sus ventajas y desventajas.

Vectores Virales	Ventajas	Limitaciones
Gammaretrovirus	Alta capacidad de transducción en células en división. Potencial para el tratamiento de enfermedades genéticas. Relativamente seguros.	Riesgo de mutagénesis y activación de enfermedades latentes. Provoca respuesta inmune. Limitación en la capacidad para cargar genes de gran tamaño (>7–8 kb). División celular para la transducción.
Lentivirus	Amplio rango de hospedadores celulares. Capacidad de infectar células no proliferativas. Menor riesgo de mutagénesis en comparación con otros retrovirus.	Capacidad de carga de genes relativamente grande, pero limitada para genes superiores a 9 kb. Puede generar riesgos de inserción genómica aleatoria y activación de oncogenes o interrupción de genes críticos.
Adenovirus	Capacidad para infectar una amplia variedad de células en división y no división. Capacidad de expresión episomal del gen de interés. Capacidad para inducir respuestas inmunes específicas.	Alta inmunogenicidad. Limitado tiempo de expresión del gen de interés. Inadecuados para transfectar células difíciles.
Herpesvirus	Capacidad para cargar genes de gran tamaño (30–40 kb). Estimula respuestas inmunitarias innatas. Aplicación como vectores de vacunas.	Complejidad de la estructura viral. Potencial riesgo de reactivación viral. Limitada capacidad de integración en el genoma celular. Limitaciones en su uso debido al conocimiento limitado sobre su mecanismo de acción.
Virus Adeno-Asociados (AAV)	Baja inmunogenicidad. Eficiencia en la transferencia génica. Seguridad en ensayos clínicos.	Capacidad de carga limitada. Limitaciones en la producción a gran escala. Potencial riesgo de integración aleatoria en el genoma celular.

1.2.3 DESVENTAJAS DE LOS VV

Las terapias génicas basadas en vectores virales, si bien son prometedoras, enfrentan desafíos significativos relacionados con la inmunogenicidad y la complejidad en su fabricación, que deben abordarse para garantizar su eficacia y seguridad (73). Entre las principales desventajas se encuentran los problemas asociados al uso de virus como vehículos de liberación de genes, como la interrupción del ADN celular, el riesgo de recuperación de la actividad patógena de los virus atenuados y la posibilidad de desencadenar respuestas inmunitarias perjudiciales en el organismo receptor. Estas respuestas pueden ser tan agudas que resultan ser tóxicas para las células huésped, limitando así la eficacia terapéutica de los VV (53).

Uno de los principales inconvenientes es la intensa inflamación y la activación de linfocitos T citotóxicos que caracterizan la respuesta inmunitaria provocada por los VV al transportar genes a órganos o tejidos específicos. Además, los anticuerpos neutralizantes pueden reducir la transducción del vector y evitar la expresión del gen terapéutico, lo que limita su aplicación clínica (74). La expresión de proteínas virales y material genético propio del virus, que resultan ser inmunogénicos, también puede acelerar la eliminación del vector y las células transducidas. Otros desafíos incluyen el tropismo viral hacia el hígado, la expresión temporal debido a errores en la integración del material genético exógeno en el genoma, así como las expresiones génicas a corto plazo y la mutagénesis de inserción (53,74).

Además, algunos VV presentan limitaciones en el tamaño del genoma que pueden transportar a las células diana, lo que dificultan el tratamiento de enfermedades causadas por genes grandes o complejos. La integración aleatoria del gen terapéutico en el genoma del huésped puede causar mutaciones no deseadas o interferir con la función normal de otros genes, especialmente con vectores como los retrovirus y lentivirus. La producción y purificación de VV pueden ser costosas y complejas, y algunos de ellos pueden ser difíciles de producir en grandes cantidades. Además, existe el riesgo teórico de reactivación viral en pacientes, sobre todo en aquellos con sistemas inmunitarios comprometidos, lo que podría desatar infecciones virales latentes a causa de la TG a la que fueron sometidos. Esto se debe a que existe la posibilidad potencial de que los virus muten y recuperen su capacidad de replicación, desencadenando enfermedades virales indeseadas (Tabla 3) (59).

Para abordar estas desventajas y avanzar en la TG, es fundamental seguir investigando y desarrollando nuevas tecnologías de vectorización que mejoren la seguridad y

eficacia. En este sentido, la nanotecnología ha desempeñado un papel crucial al proporcionar perspectivas y enfoques innovadores para el tratamiento efectivo de enfermedades genéticas y otras afecciones médicas. Los avances en el desarrollo de nanomateriales han dado lugar a nuevos vectores no virales (VNV) con el potencial de vehicular material genético, ofreciendo así nuevas oportunidades en el campo de la terapia génica. Los VNV, tanto físicos como químicos, ofrecen una alternativa más segura a los vectores virales tradicionales, ya que no presentan los problemas asociados con la respuesta inmune adversa (75). Además, en los últimos años, los VNV han mostrado una eficacia comparable a la de los VV, como se evidenció en el desarrollo de vacunas contra la enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19), donde las formulaciones basadas en nanopartículas lipídicas (LNP) superaron en eficacia a las vacunas convencionales basadas en vectores virales (76).

1.3 NANOTECNOLOGÍA Y VECTORES NO VIRALES (VNV)

La aplicación de la nanotecnología en la terapia génica ofrece numerosas ventajas, incluida una mejor entrega de material genético, protección del ADN o ARN terapéutico contra la degradación y la capacidad de dirigir específicamente el principio activo (API) a células o tejidos diana (77). La capacidad de diseñar, fabricar y aplicar materiales y dispositivos a escala nanométrica permite la manipulación, caracterización y el control de la materia a nivel molecular y atómico, lo que ha impulsado la creación de diversos nanomateriales con potencial terapéutico (78). La nanotecnología se ha convertido en un novedoso campo científico interdisciplinario, que ha promovido el desarrollo de diversas nanoestructuras con potencial para proporcionar la liberación controlada de fármacos y la administración dirigida de agentes activos (79).

El surgimiento de esta asociación se remonta a la década de 1980, cuando la nanotecnología comenzó a ganar interés. Paralelamente, en la década de 1990, la terapia génica comenzaba a dar sus primeros pasos, enfrentándose a desafíos relacionados con la entrega eficiente y segura de material genético a las células diana. Fue en este contexto que los científicos comenzaron a considerar la nanotecnología como una potencial solución para abordar estos desafíos, permitiendo el desarrollo de sistemas de entrega de genes a escala nanométrica, marcando el inicio de una nueva era en la terapia génica. En este sentido, la Tecnología Farmacéutica ha explorado el desarrollo de sistemas nanométricos que encapsulan el API dentro de un vehículo de transporte. Esta innovación facilita el paso del fármaco a través de diversas barreras biológicas del organismo, optimizando así su eficacia (80,81).

A lo largo de las décadas siguientes (2000), se produjeron avances significativos en el diseño y la síntesis de nanomateriales (NM) específicamente diseñados para esta función. Estos nanomateriales, que incluyen desde nanopartículas hasta liposomas, polímeros y dendrímeros, son diseñados para vehicular y proteger el material genético de la degradación enzimática, mejorar su estabilidad en la circulación sanguínea y facilitar su internalización celular. Con el paso del tiempo, los científicos se centraron en mejorar la especificidad y eficacia de estos sistemas que vehiculizan genes, desarrollando estrategias para dirigir selectivamente los sistemas a células específicas utilizando ligandos dirigidos o modificaciones superficiales que mejoran la interacción con receptores específicos en la superficie celular (78,80,82)

Hoy en día, la colaboración entre la nanotecnología y la terapia génica continúa avanzando rápidamente, siendo el foco de numerosas investigaciones. Se están explorando y desarrollando diversas estrategias para mejorar la entrega de genes mediante nanomateriales funcionalizados con biomoléculas específicas y sistemas de liberación controlada. Estos avances no solo prometen mejorar la eficacia terapéutica, sino también reducir la toxicidad asociada, abriendo nuevas alternativas en el tratamiento de diversas enfermedades (79,80).

1.3.1 NANOMATERIALES

Los elementos creados por medio de la aplicación de nanotecnología se conocen con el término de nanomateriales. Sin embargo, el significado sigue siendo objeto de debate y estandarización, debido a que todavía hace falta especificar normas, reglas y leyes para la identificación correcta de cuáles son los elementos que se deben considerar como nanomateriales (83). No obstante, se están considerando varias definiciones propuestas para establecer un marco regulatorio y normativo para el uso y comercialización de los nanomateriales a nivel mundial. Los nanomateriales tienen un amplio campo de aplicación y su importancia radica en sus propiedades únicas en comparación con los compuestos químicos equivalentes a tamaño macroscópico. Por lo tanto, es esencial conocer los diferentes tipos de nanomateriales, su clasificación, métodos de producción, relación entre propiedades fisicoquímicas y estructurales, áreas de aplicación y regulaciones asociadas (83,84).

Entidades como la FDA señala a los nanomateriales en el contexto de la ingeniería, la manipulación deliberada, la fabricación o la selección de materiales que tienen al menos una dimensión en el rango aproximado de 1 a 100 nm y exhiben fenómenos dependientes de la dimensión, como efectos cuánticos (85,86). El sistema de salud

canadiense (*Health Canada*) considera un nanomaterial si presenta al menos una dimensión espacial en escala nanométrica, o si es más pequeño o más grande que la nanoescala en todas sus dimensiones espaciales, y presenta uno o varios fenómenos a nanoescala (87). Esto abarca una amplia gama de productos manufacturados, materiales, sustancia, ingrediente, dispositivo, sistemas o estructuras que poseen propiedades específicas asociadas con su tamaño a escala nanométrica. La Agencia Europea de Productos Químicos (ECHA) define los nanomateriales como materiales naturales, accidentales o fabricados que contienen partículas sólidas, ya sea en estado libre o como agregados o aglomerados. En estos materiales, al menos el 50% de las partículas en la distribución numérica del tamaño tienen una o más dimensiones externas en el rango de 1 nm y 100 nm. Estas sustancias o combinaciones de sustancias están compuestas por átomos y/o moléculas, lo que les confiere composiciones químicas únicas (83,84).

Por otra parte, la norma ISO/TS 80004-3:2020 establece que un nanomaterial es aquel que tiene al menos una dimensión externa en la nanoescala (aproximadamente de 1 nm a 100 nm) o que presenta una estructura interna o superficial en esa misma escala. En los campos de la física y química, las partículas se consideran nanométricas si presentan dimensiones en el rango de 1 a 100 nanómetros, mientras que en biología se acepta como nanopartículas aquellas con dimensiones menores a 1000 nanómetros (1 µm) (Figura 8) (80). Además, la norma proporciona una definición para nano-objeto, que es una pieza discreta de material con una, dos o tres dimensiones externas en la nanoescala, siendo las segundas y terceras dimensiones externas ortogonales a la primera dimensión y entre sí (88). Actualmente, se está trabajando en la actualización de la terminología relacionada con los nanomateriales, con el fin de establecer una definición universal única. Esto facilitaría una clasificación clara y una nomenclatura estandarizada a nivel mundial, lo que permitiría una identificación más precisa de estos nanomateriales (83,89).

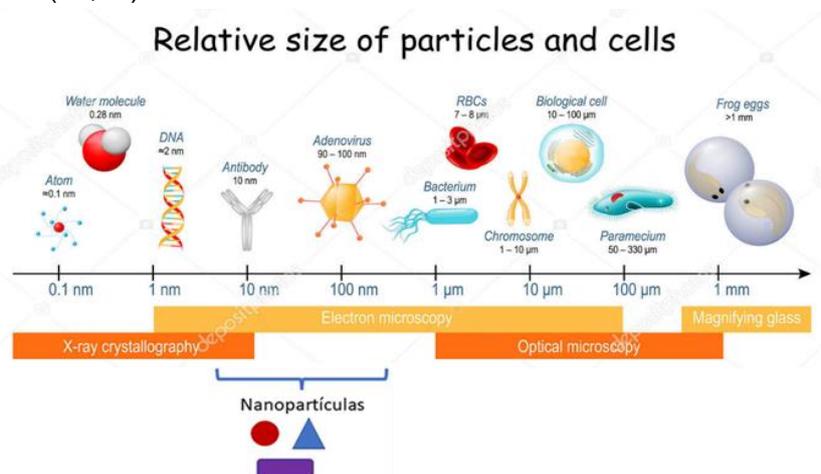


Figura 8. Representación del tamaño relativo a escala nanométrica desde el átomo hasta huevos de anfibios. Imagen ID: 425901458-www.depositphotos.com

Aunque persiste el debate respecto a la definición exacta, la nanotecnología continúa expandiéndose en diversas áreas de aplicación cotidiana. Uno de los campos que ha experimentado una notable revolución es la medicina, donde la nanotecnología ha contribuido significativamente al tratamiento más específico de enfermedades como el cáncer (77). Estos avances han permitido el desarrollo de sistemas de administración eficaces para biomoléculas como el ADN y el ARN, abriendo nuevas posibilidades en el tratamiento de enfermedades genéticas. No obstante, la administración de material genético para corregir alteraciones genéticas y de expresión proteica en las células diana ha planteado nuevos desafíos, especialmente en cuanto a cómo administrar estas biomoléculas de manera efectiva para que lleguen específicamente al sitio de acción en el paciente. Las formas farmacéuticas convencionales no son adecuadas para la administración de ADN o ARN debido a su rápida degradación en el tracto gastrointestinal y en el torrente sanguíneo (90).

Por lo tanto, se necesita investigar y desarrollar nuevas estrategias para la administración de estas biomoléculas, lo que constituye un desafío importante en el campo de la nanotecnología y la farmacia galénica. En este sentido, los nanomateriales podrían ser una alternativa potencial para vehicular ácidos nucleicos, dando origen a los denominados vectores no virales (VNV). Estos se dividen principalmente en dos categorías: los nanomateriales suaves o blandos, de naturaleza orgánica, biodegradables y no persistentes en el organismo, y los nanomateriales artificiales (duros), mayormente inorgánicos, insolubles, no biodegradables y potencialmente biopersistentes (78,80).

1.3.2 VECTORES NO VIRALES (VNV)

Los VNV representan una alternativa viable, al ofrecer formulaciones flexibles que permiten la introducción de fragmentos de ADN de mayor tamaño, presentar menos riesgos de seguridad y un menor potencial inmunogénico en comparación con los VV. Además, carecen de mutagénesis de inserción asociada a estos últimos. Los investigadores continúan en la búsqueda de un vector no viral que pueda igualar en eficacia y superar en seguridad a los vectores virales, consolidando así la relevancia de los VNV como una perspectiva clave en este ámbito de investigación (91,92).

Entre los nanomateriales inorgánicos más empleados sobresalen los nano-óxidos de diversos metales, los cuales se obtienen al reducir el tamaño de las partículas a partir de materiales naturales o de partículas previamente fabricadas de mayor tamaño. Los fullerenos y los nanotubos de carbono, por otro lado, se obtienen a través de procesos

de síntesis específicos. En ocasiones, se incorporan grupos funcionales químicos en estos nanomateriales para otorgarles las propiedades deseadas según su uso previsto o propósito particular de desarrollo (Tabla 4) (93).

Por otro lado, varios investigadores están explorando el potencial de la nanotecnología en el desarrollo de tratamientos basados en nanomateriales orgánicos, aunque muchos de estos aún no están disponibles en el mercado. Esto convierte al campo de la medicina en un desafío global, impulsando el surgimiento de diversas iniciativas comerciales e investigativas a nivel mundial para alcanzar una posición sólida en el mercado (85). Dentro de los nanomateriales orgánicos se encuentran las nanopartículas poliméricas y dendrímeros, así como las lipídicas como los liposomas, micelas, entre otros (Figura 9). Junto con el desarrollo de nuevas y eficientes tecnologías, las nanopartículas han despertado un gran interés y se han convertido en una herramienta prometedora para establecer nuevas rutas terapéuticas en la medicina, así como para diversas aplicaciones en áreas como la cosmética, agricultura, alimentación y farmacia, con especial relevancia en las terapias génicas y de ARN (Tabla 4) (50,94).

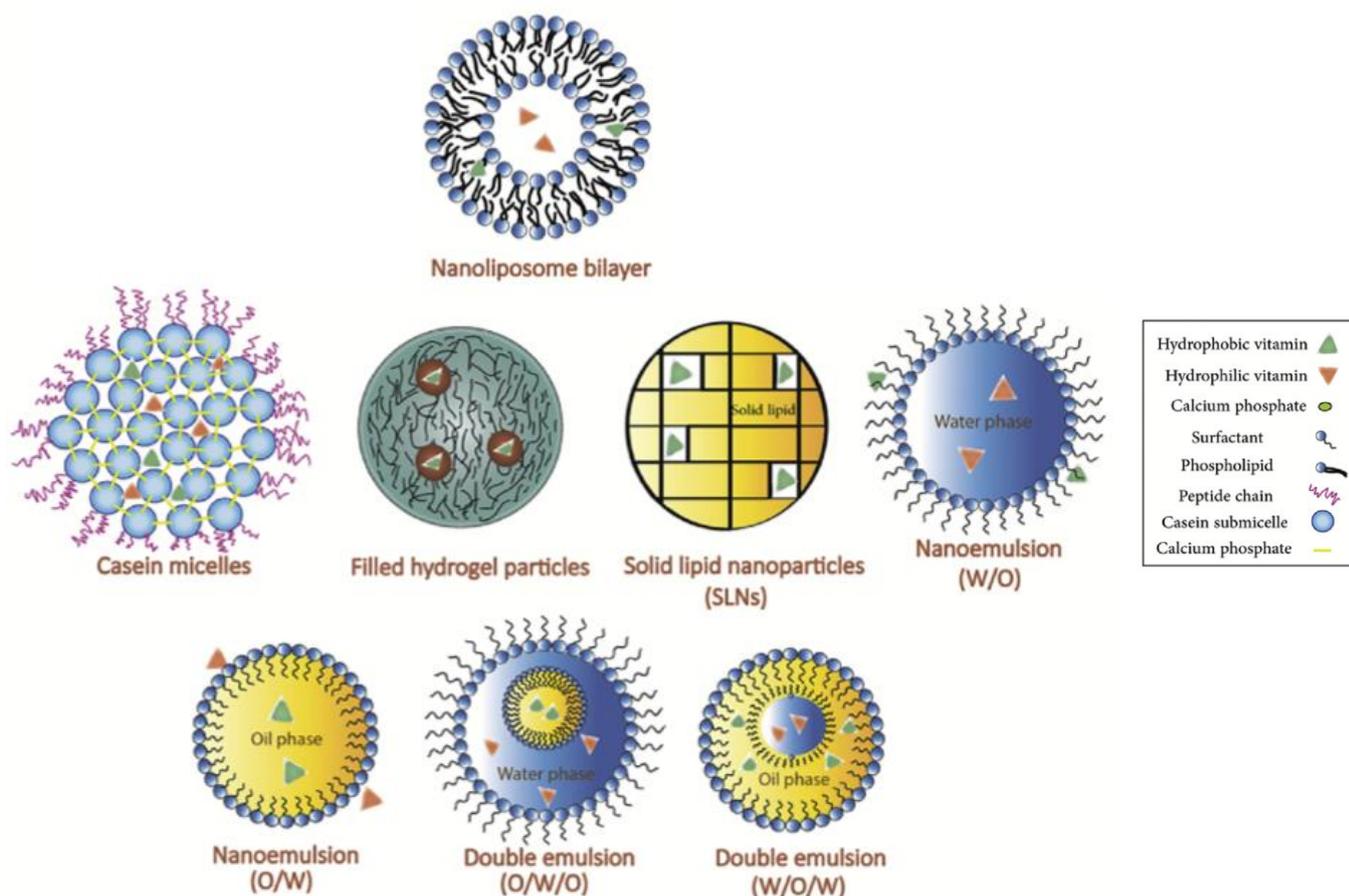


Figura 9. Tipos de sistemas de administración nanoestructurados orgánicos (207).

Tabla 4. Tipos de nanopartículas inorgánicas y orgánicas utilizadas en terapia génica junto con sus principales características.

Tipo de Nanopartícula		Características
Inorgánicas	Nanopartículas Metálicas (95)	Partículas compuestas de metales como oro, plata, hierro, entre otros. Propiedades ópticas y magnéticas únicas. Terapia génica con CRISPR- <i>Gold nanoparticles</i> .
	Nanotubos de Carbono (NTC) (93)	Estructuras cilíndricas-tubulares compuestas de carbono. Alta conductividad y resistencia mecánica.
	Quantum Dots (QDs) (96)	Nanocristales semiconductor. Propiedades ópticas y electrónicas únicas. Compuestos por elementos como el cadmio, selenio, indio, entre otros.
	Dendrímeros (97)	Macromoléculas poliméricas sintéticas con estructuras ramificadas en forma de árbol. Alta densidad de grupos funcionales en la superficie.
	Polímeros (98)	Hechas de polímeros con cadena de monómeros unidos que pueden formar nanopartículas. Variedad de composiciones y propiedades.
Orgánicas	Liposomas (99)	Vesículas esféricas compactas compuestas por una bicapa lipídica. Capacidad para encapsular material genético. Buena biocompatibilidad.
	Micelas lipídicas (100)	Esferas con un núcleo lipídico hidrofóbico y una capa superficial hidrofílica. Capacidad de carga de material genético en su núcleo lipídico. Estables en solución acuosa y biocompatibles.
	Emulsiones lipídicas (101,102)	Sistemas coloidales de lípidos dispersos en una fase acuosa. Se pueden diseñar con un tamaño de partícula específico para optimizar la administración y biodisponibilidad. Son estables en solución acuosa.
	Partículas lipídicas nanoestructuradas (NLC) (103)	Sistemas compuestos por lípidos sólidos y líquidos (aceites) en su estructura. Matriz lipídica modificada con lípidos líquidos en su núcleo.

Tabla 4. Continúa

Tipo de Nanopartícula		Características
Orgánicas	Nanopartículas lipídicas (LNP) (104)	Sistemas que utilizan lípidos para encapsular y transportar sustancias. Compuestas principalmente por lípidos, como fosfolípidos y colesterol. Estructura coloidal similar a las micelas, con un núcleo lipídico y una capa superficial hidrofílica.
	Nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) (105)	Sistemas compuestos por lípidos sólidos. Son biocompatibles y biodegradables. Matriz lipídica sólida en su núcleo.

Durante la elaboración de las nanopartículas, es relevante identificar sus características fisicoquímicas, ya que estas propiedades están estrechamente relacionadas con su comportamiento *in vitro/in vivo*. Este conocimiento permite adecuar la formulación para aplicaciones terapéuticas específicas, optimizando así su eficacia y seguridad en el tratamiento médico. Se ha observado que a medida que las nanopartículas son más pequeñas, su área superficial aumenta, lo que incrementa su adhesión a las superficies (106).

1.3.3 VENTAJAS DE LOS VNV

En la actualidad, los métodos de mayor interés para la transferencia génica son los que emplean nanomateriales químicos no virales, específicamente aquellos que utilizan nanopartículas para la transfección, gracias a sus propiedades fisicoquímicas, versatilidad en el diseño y diversos mecanismos de acción. Los VNV son más económicos y fáciles de producir en comparación con los VV. Los métodos químicos con NPs son ampliamente utilizados por su adaptabilidad, estabilidad y capacidad para transportar cargas genéticas. Son particularmente eficaces en la transfección de grandes cantidades de ADN (Tabla 5) (91).

Aunque se considera que los VNV son generalmente más seguros, su eficiencia de transfección tiende a ser inferior a la de los VV. Históricamente, los VNV han enfrentado desafíos relacionados con la toxicidad y la eficiencia de transfección (107). No obstante, se están realizando grandes esfuerzos para superar estas barreras, ya que se ha demostrado que la baja eficiencia de transfección de los VNV ya no es el mayor de los inconvenientes. Un claro ejemplo notable de este avance son las vacunas para la COVID-19 y el Onpattro-patisiran, formulaciones a base de LNPs que han mostrado altas tasas de transfección (76).

Tabla 5. Tipos de nanopartículas inorgánicas y orgánicas junto con sus ventajas y desventajas.

Tipo de Nanopartícula		Ventajas	Desventajas
Inorgánicas	Nanopartículas Metálicas	<p>Potencial para la imagenología y diagnóstico.</p> <p>Posibilidad de dirección magnética para la entrega específica.</p> <p>Facilitan la entrega de sistemas CRISPR-Cas9 a las células.</p> <p>Mayor eficiencia en la edición génica.</p>	<p>Posible toxicidad dependiendo del tipo de metal y tamaño de partícula.</p> <p>Necesidad de recubrimiento para evitar aglomeración y toxicidad.</p> <p>Costo y complejidad en la síntesis.</p>
	Nanotubos de Carbono (NTC)	<p>Alta capacidad de carga de genes.</p> <p>Facilidad de funcionalización superficial.</p>	<p>Posibilidad de toxicidad dependiendo del tamaño y forma del nanotubo.</p> <p>Necesidad de evaluación exhaustiva de la biocompatibilidad.</p>
	Quantum Dots (QDs)	<p>Alta eficiencia en la entrega de genes.</p> <p>Posibilidad de imagenología y diagnóstico avanzado.</p> <p>Fluorescencia intensa y duradera, lo que facilita su detección.</p>	<p>Posible toxicidad debido a la liberación de metales pesados.</p> <p>Necesidad de recubrimientos biocompatibles adecuados para reducir la toxicidad y mejorar la estabilidad.</p>
Orgánicas	Dendrímeros	<p>Alta capacidad de carga y protección del material genético.</p> <p>Precisión en la modificación superficial.</p> <p>Mejoran la biodisponibilidad de sustancias activas en oftalmología.</p>	<p>Costo de producción elevado.</p> <p>Posibilidad de toxicidad dependiendo del tipo de dendrímero y funcionalización.</p>
	Polímeros	<p>Alta capacidad de carga y liberación controlada de ácidos nucleicos.</p> <p>Posibilidad de modular la biodegradabilidad.</p> <p>Flexibilidad en el diseño de la superficie para mejorar la especificidad.</p>	<p>Posibilidad de toxicidad dependiendo de la composición o tamaño.</p> <p>Algunos polímeros pueden no ser completamente biocompatibles.</p> <p>Se requiere más investigación para validar su uso clínico.</p> <p>Dificultad en la estandarización de la síntesis.</p>
	Liposomas	<p>Eficiente entrega de genes.</p> <p>Protección del material genético.</p> <p>Reducción de la degradación enzimática.</p>	<p>Potencial inestabilidad y tendencia a la agregación.</p> <p>Algunas formulaciones pueden desencadenar respuestas inmunes.</p> <p>Limitaciones en la degradación en tejidos periféricos.</p> <p>Necesidad de optimizar la dosis y la eficacia.</p>
	Micelas lipídicas	<p>Protegen el material genético de la degradación en el entorno biológico.</p> <p>Facilitan la internalización celular del material genético al fusionarse con las membranas celulares.</p> <p>Pueden liberar el material genético de manera controlada.</p>	<p>Baja eficiencia de transfección comparado con otros vectores para terapia génica.</p> <p>Capacidad de carga limitada por el tamaño de las micelas.</p> <p>Se requiere más investigación para demostrar su eficacia en modelos animales y humanos.</p>

Tabla 5. Continúa

Tipo de Nanopartícula	Ventajas	Desventajas
Emulsiones lipídicas	Emulsiones lipídicas que pueden encapsular ácidos nucleicos. Facilitan la absorción y distribución del material genético en el cuerpo. Compatibilidad celular debido a su capacidad para fusionarse con las membranas celulares.	Baja eficiencia de transfección comparado con otros vectores para terapia génica. Algunos lípidos pueden ser tóxicos para las células. Se requiere más investigación para demostrar su eficacia en modelos animales y humanos.
Partículas lipídicas nanoestructuradas (NLC)	Mejora de la estabilidad y capacidad de carga de fármacos. Mayor capacidad de carga de fármacos. Facilitan la absorción y distribución del material genético en el cuerpo. Compatibilidad celular debido a su capacidad para fusionarse con las membranas celulares.	Baja eficiencia de transfección comparado con otros vectores para terapia génica. Algunos lípidos pueden ser tóxicos para las células. Se requiere más investigación para demostrar su eficacia en modelos animales y humanos.
Orgánicas		
Nanopartículas lipídicas (LNP)	Mayor capacidad de carga de fármacos. Facilitan la absorción y distribución del material genético en el cuerpo. Compatibilidad celular debido a su capacidad para fusionarse con las membranas celulares.	Baja eficiencia de transfección comparado con otros vectores para terapia génica. Algunos lípidos pueden ser tóxicos para las células. Se requiere más investigación para demostrar su eficacia en modelos animales y humanos.
Nanopartículas sólidas lipídicas (SLN)	Buena capacidad de carga de fármacos. Estables en solución acuosa. Pueden proteger el material genético frente a la degradación. Compatibilidad celular debido a su capacidad para fusionarse con las membranas celulares.	Baja eficiencia de transfección comparado con otros vectores para terapia génica. Algunos lípidos pueden ser tóxicos para las células. Se requiere más investigación para demostrar su eficacia en modelos animales y humanos.

1.3.4 DESVENTAJAS DE LOS VNV

Trabajar con VNV presentan limitaciones debido a su inestabilidad y a las barreras naturales presentes en los organismos vivos. Por esta razón, se buscan modelos que optimicen estos procesos, resaltando tanto las nanopartículas inorgánicas como las orgánicas. La introducción de transgenes en las células para transfectarlas resulta más complicada con VNV, ya que su capacidad de penetración es limitada a causa de su inestabilidad y a los mecanismos de reconocimiento de sustancias extrañas presentes en los seres vivos, los cuales pueden neutralizarlas (Tabla 5) (107).

En la práctica clínica, los VNV son difíciles de aplicar debido a su limitada eficacia y a la necesidad de instrumental específico y técnicas complejas. Además, los sistemas de

administración de genes no virales siguen siendo menos eficientes en comparación con los VV (91). La elevada sensibilidad de las NPs al estrés fisicoquímico durante su elaboración y almacenamiento representa una de las principales dificultades para su aplicación en el ámbito farmacéutico. Para abordar estos problemas, se han desarrollado diversas nanopartículas lipídicas, aprovechando sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo que las hace menos tóxicas para las aplicaciones *in vivo* (104,105).

Estas nanopartículas presentan una estructura coloidal compleja que requieren métodos especializados para su caracterización fisicoquímica y estructural. Los sistemas lipídicos se pueden clasificar en diferentes tipos, incluyendo sistemas vesiculares como los liposomas, así como nanoemulsiones y otras formas de nanopartículas lipídicas (104).

1.4 NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS (SLN)

En los últimos años, ha surgido un creciente interés en el empleo de nanopartículas como vehículos para transportar ADN/ARN. Específicamente, las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) han resaltado como una opción prometedora debido a su capacidad para proteger y liberar eficientemente ácidos nucleicos terapéuticos en las células diana. Este enfoque ha ganado cada vez más importancia como uno de los métodos más prometedores para la terapia génica (66,108–110).

Las SLNs representan la primera generación de LNPs. Son nanoesferas compuestas por un núcleo o matriz lipídica sólida, con un diámetro medio entre 50 y 1000 nm, rodeadas por una capa de tensioactivos. Esta estructura sólida proporciona estabilidad a la nanopartícula y facilita el transporte de fármacos poco solubles, ofreciendo varias ventajas sobre los sistemas tradicionales de administración de fármacos. Se ha evaluado su eficacia en la entrega de una variedad de moléculas activas, que incluyen péptidos, proteínas y ácidos nucleicos (75,111). Las SLNs se caracterizan por su estabilidad física, que se determina mediante parámetros como el tamaño de las partículas, el potencial zeta, la cristalinidad y la composición lipídica. Se fabrican sustituyendo el lípido líquido de las emulsiones por un lípido sólido, lo que resulta en una estructura sólida tanto a temperatura ambiente como a temperatura corporal (75,104).

Entre las ventajas destacadas de las SLNs se encuentra la eliminación del uso de solventes orgánicos, siendo reemplazados por lípidos fisiológicamente aceptables para su administración en la piel, por vía oral y por vía intravenosa (75). En estos sistemas,

el fármaco se dispersa principalmente en forma molecular, lo que contribuye a mejorar su biodisponibilidad y biocompatibilidad, al no degradarse bajo la influencia de agentes como la luz y el agua. Además, su capacidad de liberación puede ser prolongada para sustancias poco solubles en agua incorporadas a la matriz lipídica sólida (103). Adicionalmente, estas nanopartículas pueden ser utilizadas como sustancias hidrofílicas, lo que influye en la absorción del fármaco, aumenta su capacidad de solubilización, previene la precipitación en la dilución intestinal y mejora la permeabilidad de la membrana, así como la producción de quilomicrones (75).

Estos sistemas no virales son seguros y su producción resulta simple, económica y reproducible en comparación con los vectores virales. Además, no tienen restricciones de tamaño para el material genético. A pesar de estas ventajas, las SLNs presentan algunas limitaciones, como el crecimiento de las partículas durante el almacenamiento, la tendencia a la gelificación y los cambios polimórficos inesperados, así como su capacidad limitada de incorporación de fármacos debido a la estructura cristalina del sólido lipídico (79). Adicionalmente, podrían interactuar con proteínas plasmáticas y otras proteínas extracelulares, lo que podría inactivarlas debido a su superficie hidrofóbica y catiónica. Uno de los principales inconvenientes es la menor eficacia de transfección en comparación con los vectores virales, aunque los avances realizados en los últimos años han permitido mejorarla (90). Tanto los vectores virales como los no virales son herramientas esenciales en la terapia génica y las terapias basadas en ARN. Cada tipo tiene sus propias ventajas y limitaciones, y la elección del vector adecuado depende de la aplicación específica y las consideraciones de seguridad.

1.4.1 EXCIPIENTES UTILIZADOS PARA FABRICAR SLNs

La fabricación de nanopartículas sólidas lipídicas catiónicas (cSLN) implica la cuidadosa selección de excipientes como componentes esenciales, los cuales no poseen actividad farmacológica directa, pero son fundamentales para garantizar la estabilidad, biocompatibilidad, eficacia y seguridad de los medicamentos. Estos sistemas están compuestos por excipientes biocompatibles fisiológicamente aceptados, como lípidos y ácidos grasos. Su matriz sólida puede proteger eficazmente los ingredientes farmacéuticos activos y proporcionar flexibilidad máxima en la modificación de los perfiles de liberación del fármaco (75). La composición de las SLNs incluye una combinación de lípidos sólidos a temperatura ambiente, tensioactivos o surfactantes y agua (112). A continuación, se detallan algunos de los excipientes comúnmente utilizados, así como su función e importancia en la estructura de las cSLNs.

- **Lípidos matriciales:** Estos lípidos forman la base y constituyen la estructura de la matriz lipídica de las SLN. Ayudan a mantener la integridad estructural de las partículas, proporcionan capacidad de carga para el fármaco y brindan estabilidad durante el almacenamiento y la administración. Además, contribuyen a controlar la liberación sostenida de los principios activos encapsulados. Entre los lípidos sólidos más utilizados en la preparación de SLNs se encuentran el estearato de glicerilo, el tripalmitato de glicerilo, el compritol ATO 888, el plecirol ATO 5, el monoestearato de glicerina (GMS), el monooleato de glicerina (GMO), triglicéridos de cadena media (TCM), fosfolípidos, ceras, alcoholes y ácidos grasos (113,114).
- **Lípidos catiónicos:** Estos lípidos son esenciales en las SLN catiónicas debido a su capacidad para conferir carga positiva a las partículas. Esta carga facilita la interacción con el ADN o ARN, lo que promueve la transfección celular y mejora la eficiencia de liberación posterior del fármaco en las células diana. Además, los lípidos catiónicos contribuyen a la estabilidad de las nanopartículas y mejoran su capacidad de encapsulación de material genético. La carga también potencia la interacción con las células y la penetración en los tejidos. Entre los lípidos catiónicos más utilizados en la preparación de cSLNs se encuentran la ditetradecilfosfatidiletanolamina (DC-Chol), el N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), el clorhidrato de cetiltrimetilamonio (CTAB), la octadecilamina, entre otros (115,116).
- **Surfactantes o tensioactivos:** Los emulsionantes se utilizan para estabilizar la interfaz aceite-agua durante la producción de las SLN. Estos compuestos desempeñan un papel crucial al mantener la estructura de las SLN y prevenir la aglomeración de las partículas, lo que mejora su dispersión y solubilidad en medios acuosos. Además, estabilizan las partículas lipídicas y mejoran su dispersión, facilitando así su administración y biodisponibilidad. Los tensioactivos también ayudan en la prevención de la agregación y pueden influir en la liberación del fármaco. Algunos de los tensioactivos comúnmente utilizados en formulación de SLN incluyen el polisorbato 80 (Tween 80), el estearato de polioxietileno-sorbitano, la lecitina de soja, el poloxamer 188 o 407, el Tween 20, el Span 20, el alcohol polivinílico (PVA), entre otros (117,118).

A estos excipientes básicos para la formulación de las cSLNs se les puede adicionar:

- **Agentes quelantes:** Tales como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), se utilizan para eliminar impurezas metálicas presentes en la formulación. La presencia de metales puede catalizar la oxidación y degradación de los lípidos, lo que reduce

la estabilidad de las SLNs durante el almacenamiento. La inclusión de estos agentes contribuye a prolongar la vida útil de las nanopartículas (119,120).

- **Antioxidantes:** Protegen los lípidos de la oxidación y mantienen la estabilidad de las partículas durante el almacenamiento. Se pueden incluir antioxidantes como el alfa-tocoferol, el ácido ascórbico, la vitamina E (α -tocoferol), entre otros (121).
- **Estabilizadores de pH:** El pH juega un papel crucial en la estabilidad de las cSLNs, por lo que se puede mantener dentro de un rango óptimo para minimizar la degradación de los componentes de la formulación. Para ello, se utilizan fosfato de sodio monobásico o fosfato de sodio dibásico para mantener un pH óptimo (122).

Al seleccionar adecuadamente estos excipientes, se puede obtener una formulación de cSLN con características óptimas de estabilidad, capacidad de carga y eficacia terapéutica.

1.4.2 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE SLNs

Las técnicas de fabricación de SLNs son fundamentales para garantizar su calidad y eficacia. Se han desarrollado diferentes enfoques químicos interesantes para la síntesis de estas nanopartículas, cada uno con su función específica y contribución a la estructura final de las partículas. Al seleccionar el método de fabricación, es relevante considerar la optimización de las necesidades y limitaciones energéticas del proceso. Además, se deben evaluar minuciosamente las propiedades fisicoquímicas de las sustancias activas, así como la estabilidad física, química y biológica de estas sustancias, junto con las características de la nanoformulación final. También es determinante tener en cuenta la viabilidad de la producción y los aspectos económicos asociados (123).

Existen tres categorías principales de técnicas de fabricación de SLNs, clasificadas según la cantidad de energía utilizada: métodos de alta energía, métodos de baja energía y otros métodos que no dependen de la intensidad de la energía (112,123). Entre las técnicas empleadas se encuentran la homogeneización a alta presión, ya sea en caliente o en frío, así como la homogeneización ultrasónica o de alta velocidad, entre otras. La elección del método de preparación está fuertemente influenciada por las características del lípido y del fármaco que se desea encapsular (112). A continuación, se describen algunas de las técnicas comunes utilizadas en la fabricación de SLNs.

1.4.2.1 Homogenización en Caliente

La homogeneización en caliente se realiza a temperaturas superiores a la temperatura de fusión del lípido. Durante este proceso, el lípido y el fármaco se funden y se combinan con un tensioactivo acuoso a la misma temperatura, dando lugar a una preemulsión caliente. Posteriormente, se utiliza un homogeneizador para emulsionar la preemulsión y generar una emulsión coloidal caliente. Las gotas de esta emulsión se recristalizan al enfriarse a temperatura ambiente. En algunos casos, es necesario aplicar un tratamiento térmico específico, como el enfriamiento a condiciones de refrigeración o a temperaturas bajo cero. La calidad de la preemulsión afecta en gran medida la calidad del producto final. Un aumento en el número de ciclos o en la presión de homogeneización suele provocar un incremento en el tamaño de las partículas debido a la coalescencia, causada por la alta energía cinética. Finalmente, la nanoemulsión resultante se enfría a temperatura ambiente, lo que permite que el lípido se recristalice y dé origen a la formación de las nanopartículas (75).

1.4.2.2 Método de Emulsificación-Evaporación del Solvente

En el método de emulsificación- evaporación del solvente, se disuelven el lípido catiónico y el fármaco en un solvente orgánico. Posteriormente, esta solución se emulsiona en una fase acuosa mediante un emulsionante. Luego, se procede a evaporar el solvente para formar las SLNs. Esta técnica desempeña un papel fundamental al permitir la encapsulación eficiente del fármaco en las partículas lipídicas, controlando así el tamaño y la distribución de estas. La formación de una emulsión entre la fase acuosa y la fase orgánica, donde los lípidos se disuelven, es esencial en este proceso, seguida de la difusión del solvente orgánico hacia la fase acuosa. La posterior evaporación del solvente conduce a la formación de las partículas sólidas lipídicas. La emulsificación asegura una distribución homogénea de los lípidos y otros componentes en la fase acuosa, mientras que la evaporación controlada del solvente contribuye a la formación de partículas con las características fisicoquímicas deseadas, como tamaño, distribución y carga (123).

1.4.2.3 Coacervación Iónica

La coacervación iónica se fundamenta en la interacción electrostática entre lípidos catiónicos y polímeros aniónicos, formando complejos. En este proceso, los lípidos catiónicos se organizan formando una capa alrededor del núcleo lipídico, lo que da lugar a la formación de las SLNs con carga positiva. Su función principal es estabilizar las partículas y mejorar la carga superficial, aspectos cruciales para asegurar la formación

de las cSLNs. Esta técnica es útil para controlar la carga superficial de las partículas y promover la interacción con material genético para aplicaciones de terapia génica (124).

1.4.2.4 Método de Precipitación por Dispersión de Solvente

El método de precipitación por dispersión de solvente comienza con la disolución inicial del lípido catiónico y el fármaco en un solvente orgánico. Posteriormente, esta solución se dispersa en una fase acuosa, donde tiene lugar la precipitación de las SLNs. Esta técnica tiene como función principal facilitar la formación de partículas sólidas y controlar su morfología y cristalinidad, lo que resulta fundamental para garantizar la calidad de las SLNs. En este proceso, la disolución del lípido en el solvente orgánico se combina con la adición de esta solución a la fase acuosa. La incompatibilidad entre el solvente orgánico y el agua promueve la precipitación del lípido y la formación de las partículas sólidas lipídicas. La precipitación controlada es esencial para obtener partículas con propiedades específicas, como tamaño y carga superficial, lo que determina en gran medida su aplicación en diversas áreas terapéuticas (125).

1.4.2.5 Método con Ultrasonido

El método de ultrasonificación implica la aplicación ultrasonido de alta frecuencia a la mezcla de lípidos y fármaco para formar las SLNs. Su función principal es fragmentar las partículas grandes y mejorar la homogeneidad de la mezcla. Esta técnica es crucial para controlar el tamaño y la dispersión de las partículas, lo que influye significativamente en su calidad y eficacia (126).

1.4.2.6 Método Microfluídico

A diferencia de los métodos previamente mencionados para la fabricación de SLNs, se han desarrollado métodos para la producción de LNPs utilizando mezcladores microfluídicos. Estos mezcladores se pueden clasificar como activos o pasivos. En los activos, el flujo de líquidos se ve influenciado por perturbaciones electrohidrodinámicas, mientras que, en los pasivos, se aprovecha la geometría del chip microfluídico para aumentar la interfaz entre los fluidos y mejorar la mezcla (127). Los nuevos métodos de producción de LNPs, basados en la mezcla rápida de etanol y agua para encapsular ácidos nucleicos, presentan ventajas relacionados con la reproducibilidad, escalabilidad de producción y eficiencia de encapsulación (73,127).

1.4.2.7 Método Micromulsificación Caliente

El método de microemulsificación caliente fue empleado en esta tesis doctoral para la obtención de SLNs, las cuales se generan a partir de nanoemulsiones de aceite en agua (o/w). En este proceso, una fase lipídica fundida se dispersa en una mezcla de agua, lípido catiónico y tensioactivo. La formación de la microemulsión es espontánea debido a la alta relación entre tensioactivos y lípidos (Figura 10).

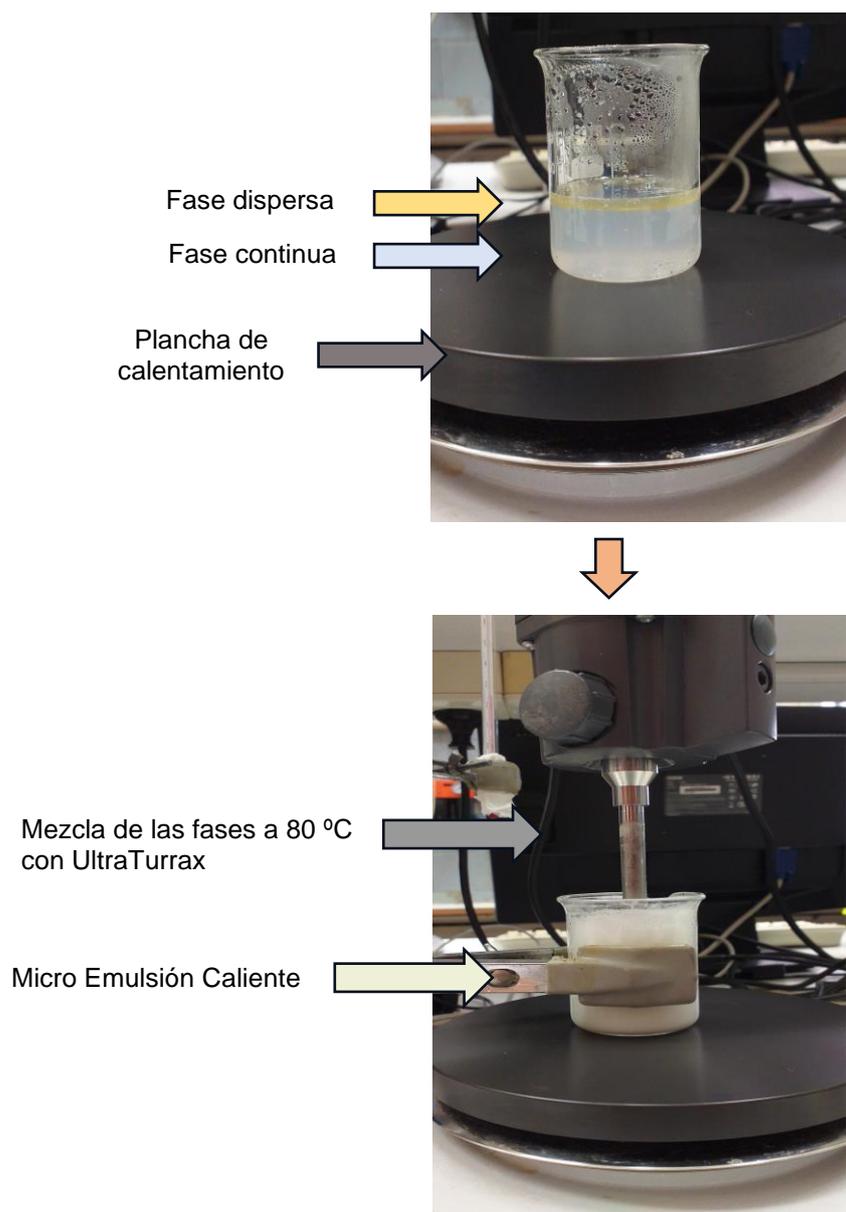


Figura 10. Imágenes de la emulsión o/w caliente para fabricar SLN.

Una de las características principales de este método es el uso de un lípido sólido a temperatura corporal, asegurando que las SLNs permanezcan en estado sólido después de su administración, lo que proporciona una matriz estable que controla la liberación

del API, mejorando así su solubilidad y biodisponibilidad. Este método, comúnmente empleado para fabricar SLNs, requiere una proporción adecuada de excipientes, a menudo evaluada mediante diagramas pseudoternarios para analizar y describir las áreas de formación de las microemulsiones (75,128).

El procedimiento es relativamente simple e implica, en primer lugar, fundir los lípidos a una temperatura que esté por encima de su punto de fusión, pero por debajo del punto de ebullición del agua. Esta fusión produce una fase lipídica líquida que se dispersa en una solución acuosa tensioactiva caliente para dar origen a la emulsión. Luego, se aplica una ultra agitación utilizando un homogeneizador de alta velocidad (UltraTurrax) para formar una microemulsión homogénea y estable. Posteriormente, esta microemulsión caliente se mezcla inmediatamente con un gran volumen de agua fría (1–4 °C), seguida de ultra agitación adicional (Figura 11). Este proceso conduce a la cristalización de los lípidos y la formación de las SLNs con una morfología esférica y una distribución de tamaño uniforme (75,115).

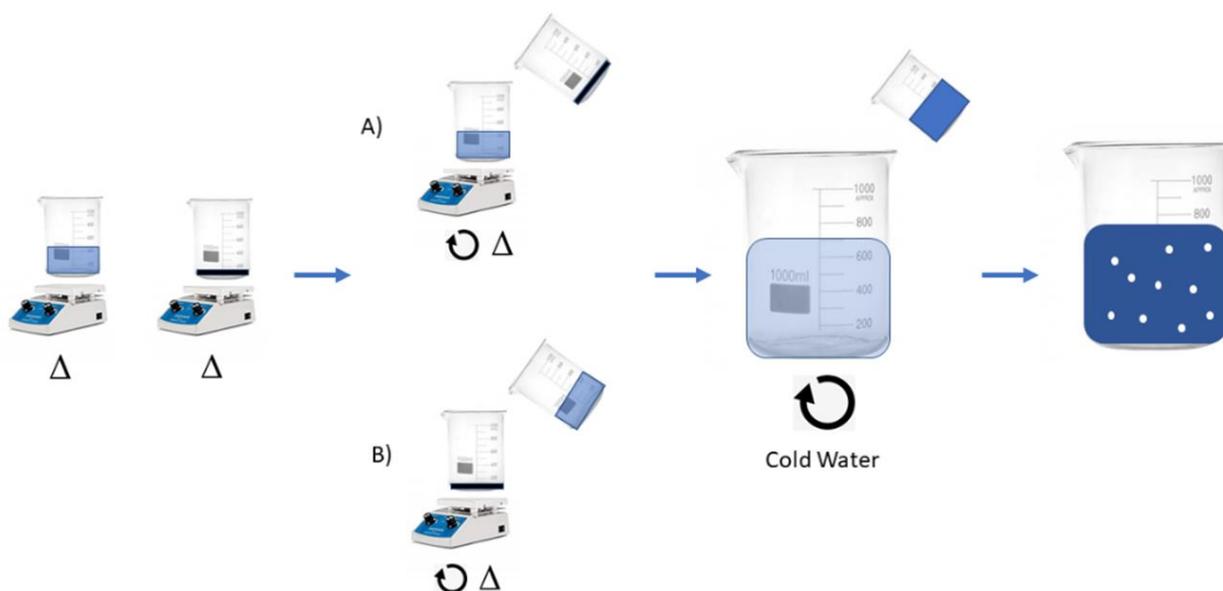


Figura 11. Esquema de preparación de las SLNs por el *Hot Microemulsification Method* (90).

Una característica relevante de este método es la temperatura utilizada para fabricar las SLNs, ya que implica un shock térmico para la formación de las nanopartículas. Además, el uso de agua ultrapura MiliQ como solvente para preparar la emulsión elimina la necesidad de recurrir a solventes orgánicos altamente tóxicos para la salud. Estos parámetros son importantes para seleccionar los excipientes que conformarán la estructura de las SLNs. Asimismo, las SLNs obtenidas mediante este método suelen ser

estables y reproducibles, lo que las hace adecuadas para aplicaciones farmacéuticas y de liberación de fármacos (129).

1.5 FORMACIÓN DE COMPLEJOS ENTRE cSLNs Y ÁCIDOS NUCLEICOS

Las nanopartículas catiónicas sólidas lipídicas (cSLN) representan una alternativa no viral para la terapia génica, utilizando lípidos biocompatibles y biodegradables para generar nanoestructuras con carga superficial positiva. Estas partículas tienen la capacidad de formar complejos con ADN/ARN (SLNplejos), lo que las convierte en un área de investigación activa en el campo de la nanomedicina. Uno de los principales componentes de las cSLNs, como sistemas de administración de ácidos nucleicos, son los lípidos catiónicos. Estos lípidos tienen la capacidad de interactuar con los grupos fosfato cargados negativamente presentes en los extremos de las cadenas del material genético mediante interacciones electrostáticas, formando complejos estables (Figura 12). Esta interacción protege el ADN/ARN de la degradación enzimática en el entorno celular, de la desnaturalización y mejoran su estabilidad en el medio extracelular. Además, los complejos resultantes son mínimamente tóxicos y evitan la respuesta inmunológica (121,123).

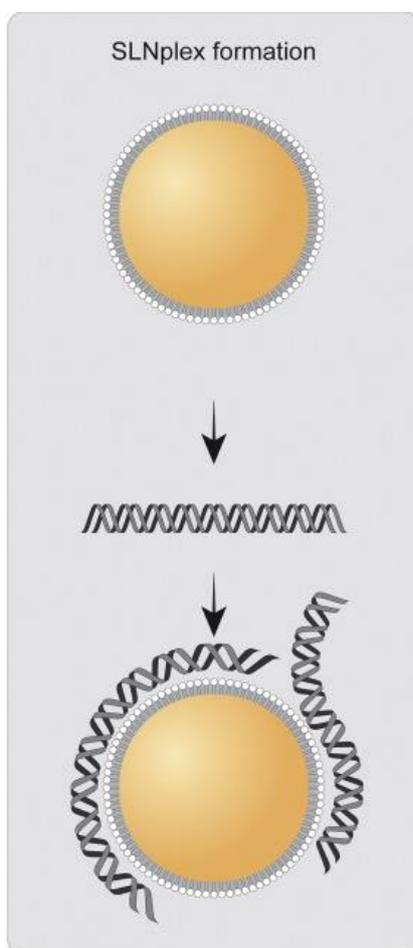


Figura 12. Representación esquemática de la formación de un SLNplejo (62).

En este sentido, los plásmidos y las secuencias cortas de ARN no codificante, como los siARN, pueden utilizarse como agentes terapéuticos y transportarse mediante cSLNs. Sin embargo, los procesos de fabricación complejos y difíciles de escalar, junto con los costos y las eficiencias de transfección relativamente bajas en comparación con los vectores virales, siguen siendo obstáculos importantes para su aplicación clínica generalizada en humanos. A pesar de estos desafíos, se están realizando esfuerzos significativos para superar estas limitaciones (130–132). De hecho, ya existen formulaciones de nanopartículas basadas en lípidos disponibles en el mercado para el tratamiento de enfermedades humanas (133).

La internalización de los SLNplejos y la liberación de material genético que transportan dentro de las células son procesos cruciales en la terapia génica. Una vez dentro del entorno celular, estos complejos pueden ser internalizados por las células objetivo y liberar el material genético en el citoplasma. Tras el ingreso dentro de la célula, los complejos de lípidos se desestabilizan y se unen a los receptores de la membrana celular mediante interacciones lipídicas, continuando así con la ruta de internalización celular (Figura 13) (134,135), que se detalla a continuación:

- **Endocitosis:** La internalización de los SLNplejos ocurre principalmente por endocitosis, a través de procesos como la endocitosis mediada por receptor o por pinocitosis. Los complejos son capturados por vesículas de endocitosis, que se invaginan y fusionan con los endosomas tempranos.
- **Formación de endosomas:** Una vez internalizados, los complejos se encapsulan en endosomas, que son vesículas membranosas derivadas de la membrana celular.
- **Escape de endosomas:** Los complejos deben escapar de los endosomas para liberar el material genético al citoplasma antes de ser degradados por los lisosomas. Para facilitar este escape, se pueden emplear diversas estrategias como la acidificación del endosoma, la permeabilización de la membrana o la ruptura de la vesícula. Se pueden emplear estrategias para facilitar el escape de los complejos de los endosomas, como el diseño de lípidos que promuevan la ruptura de la membrana endosómica.
- **Liberación en el citoplasma o núcleo:** Una vez liberados, el material genético puede entrar en el citoplasma o el núcleo, donde puede ser transcrito y expresado.
- **Interacción con el material genético:** El material genético liberado puede interactuar con la maquinaria celular para realizar su función, como la transcripción de ARNm o la integración de ADN. En el núcleo, puede ser transcrito y expresado.

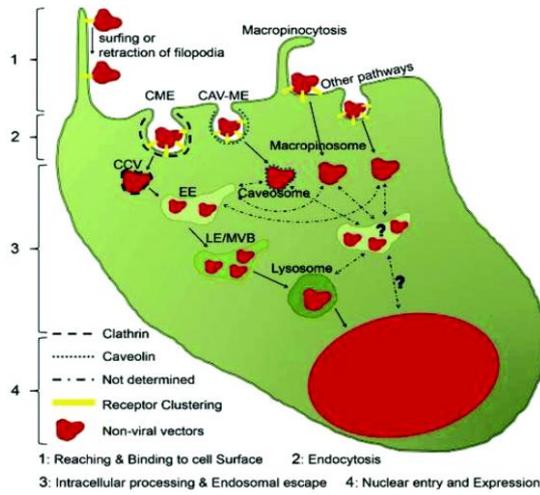


Figura 13. Ilustración esquemática de las vías de entrada y barreras celulares que pueden seguir los SLNplejos (78).

1.6 PEGILACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Como se mencionó previamente (Sección 1.3.4), las nanopartículas enfrentan diversos desafíos, como la degradación del material genético por nucleasas y el reconocimiento de las partículas como extrañas por el sistema inmunológico del hospedador. A menudo, se modifican las características superficiales de las nanopartículas para mejorar su biodisponibilidad. En este sentido, la incorporación de poli(etilenglicol) (PEG) a la formulación principal ofrece varias ventajas. El PEG es un polímero hidrófilo, flexible, sintético, no iónico, soluble en agua, biodegradable, biocompatible, de carga neutra, no tóxico (Figura 14) y ampliamente utilizado en los sectores farmacéutico, cosmético y alimentario (136).

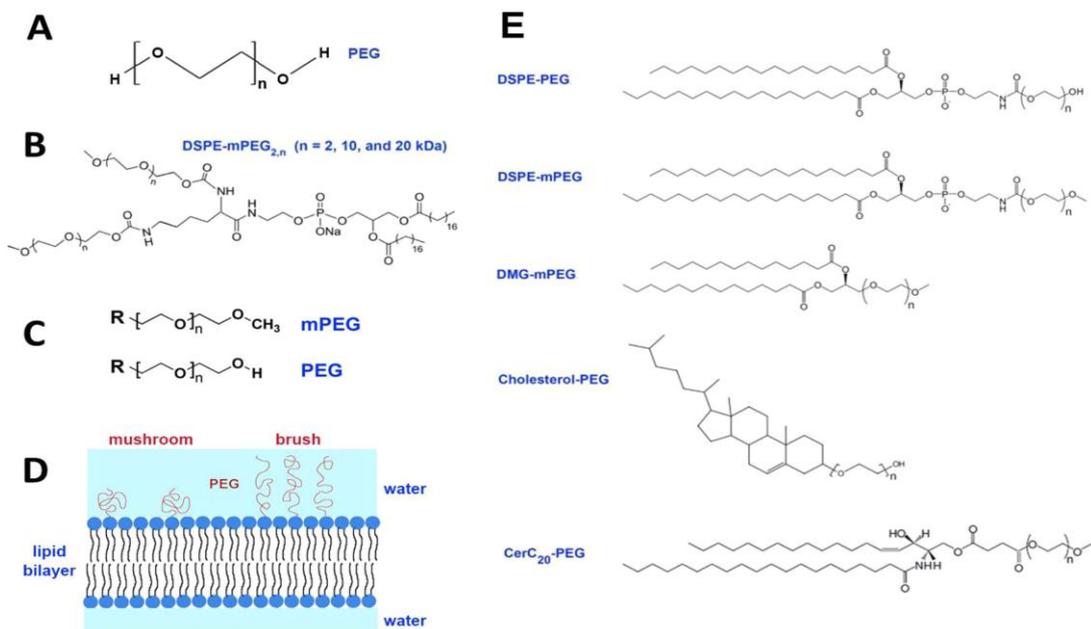


Figura 14. (A) Fórmula química del polietilenglicol (PEG); (B) estructura química de un lípido PEG ramificado; (C) grupos terminales PEG y mPEG; (D) configuraciones de cadenas de PEG en forma de hongo versus en cepillo; y (E) estructuras de los lípidos PEG ampliamente utilizados en formulaciones de LNP (144).

La PEGilación es una técnica versátil que permite superar varias limitaciones farmacológicas, mejorando las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Además, también mejora las propiedades farmacocinéticas, ya que aumenta la vida media, reduce el reconocimiento por el sistema inmune, mejora su resistencia al ataque proteolítico y aumenta su solubilidad y estabilidad (137,138). La definición de PEG se refiere al polímero formado por la repetición de moléculas de óxido de etileno y agua, que puede presentarse en estado líquido o sólido ceroso (139). El término PEGilación se utiliza para describir la unión covalente de PEG a un fármaco o compuesto, generando un derivado muy estable conocido con el nombre genérico de PEGilado, que se caracteriza por su rápida absorción y eliminación, lo que permite mantener concentraciones plasmáticas estables durante un periodo prolongado (138).

Hace aproximadamente 20 años, se aprobaron las primeras proteínas PEGiladas, lo que ha generado una enorme experiencia clínica con este material polimérico. El concepto de PEGilación se introdujo a finales de la década de 1970, respaldado por estudios que evidenciaron la unión de proteínas al PEG y los beneficios de prolongación del tiempo de circulación sanguínea de la albúmina PEGilada de 12 a 48 horas, sin provocar respuestas inmunitarias. No obstante, no fue sino hasta principios de la década de 1990 cuando se comenzó a aprobar el uso en seres humanos de las primeras proteínas PEGiladas, como la Adenosin Deamidasa y la Catalasa de Hígado Bovino. Investigaciones realizadas durante las décadas de 1980 y 1990 revelaron que la principal ventaja de la PEGilación era prolongar el tiempo de circulación en sangre de las proteínas conjugadas, en lugar de reducir su inmunogenicidad (138).

Actualmente, el PEG es el polímero más utilizado para recubrir nanopartículas, las “enmascara” (Figura 15), y podría considerarse el estándar de oro (*gold standard*) de los polímeros que brindan esta propiedad de “invisibilidad” (140). La mayoría de los sistemas de administración de fármacos basados en el recubrimiento de la superficie por polímeros, disponibles comercialmente y los que se encuentran en ensayos clínicos avanzados contienen PEG. Ningún otro polímero sintético ha alcanzado todavía este estatus (140). Por ejemplo, los productos farmacéuticos de nanopartículas lipídicas recientemente aprobados para uso médico humano, como las vacunas contra la COVID-19 y el Onpattro-patisiran, están compuestos por nanopartículas PEGiladas, las cuales, las primeras pertenecen al grupo de las Lipid Nanoparticles (LNP), mientras que las segundas son SLNs (141).

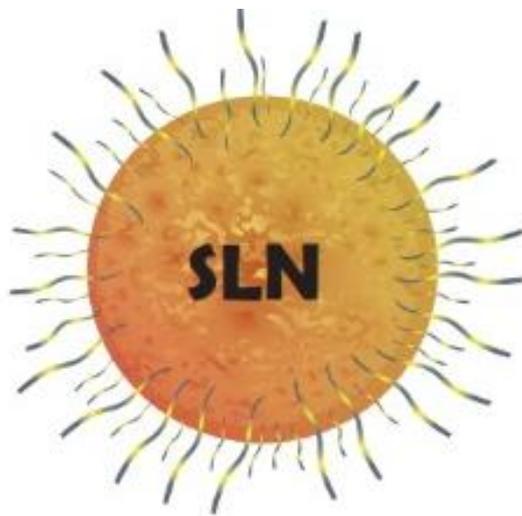


Figura 15. Ilustración de la PEGilación de una SLN (208).

El PEG actúa como un agente modificador de la superficie al “enmascarar” las nanopartículas, creando una barrera estérica en forma de capa que evita la agregación de partículas y protege su superficie de interacciones con proteínas y biomacromoléculas (nucleasas) presentes en la sangre, el citosol y los lisosomas (65,138). Esta modificación superficial se debe a la variación de las longitudes de las cadenas de carbono de los PEGs (Figura 16), lo que modifica el área de contacto superficial de las nanopartículas. Para garantizar el éxito del recubrimiento, es crucial considerar la longitud y densidad superficial de las cadenas de PEG, junto con los grupos terminales funcionales (139,142). Las propiedades repulsivas del PEG son importantes para mitigar la degradación enzimática y preservar la integridad estructural de los PEG-SLNplejos (140,143).

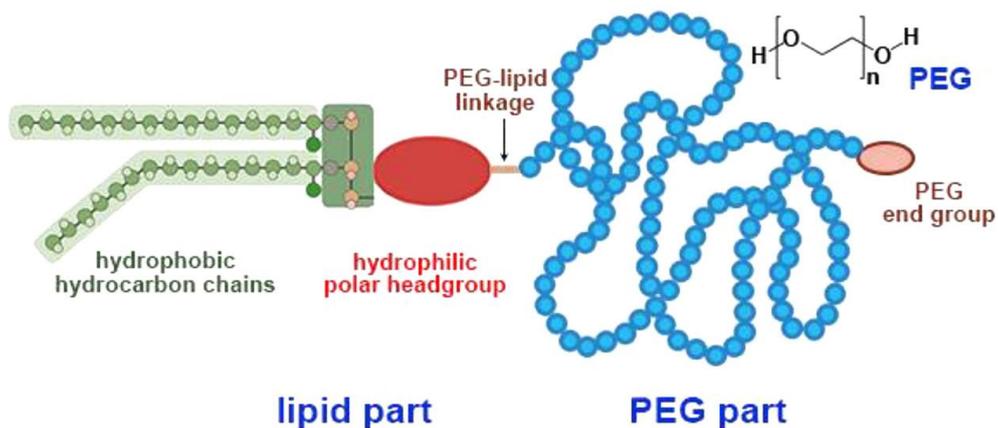


Figura 16. Esquema de la estructura de un lípido PEGilado (144).

El rendimiento biológico y la eficacia de las nanopartículas PEGiladas dependen de la longitud de la cadena de PEG. Longitudes mayores de PEG proporcionan hidrofiliicidad y flexibilidad mejorada, evitando interacciones no deseadas con biomoléculas. Aun así, existe un límite para la longitud del PEG por encima del cual su efecto sobre la adsorción de proteínas se vuelve insignificante. Por lo general, se utilizan PEG más grandes (20 a

50 kDa) en fármacos de baja masa molar (p. ej., oligonucleótidos, iARN y moléculas pequeñas), lo que incrementa el tamaño del vehículo farmacéutico para evitar la eliminación renal. Por el contrario, los PEG más pequeños (1 a 5 kDa) se utilizan en formulaciones de fármacos más grandes como anticuerpos y nanopartículas (144).

Además, el PEG presenta interacción electrostática con ácidos nucleicos, capacidad para adaptarse a distintas formas y tamaños, resistencia a la degradación, habilidad de translocación y capacidad para estabilizar el ADN plasmídico (142). La PEGilación puede adoptar una estructura lineal, ya sea con una única cadena de PEG o con múltiples cadenas, con la flexibilidad de variar en tamaños e incluso presentar cadenas ramificadas (Figura 14). Esta técnica ofrece una amplia variedad de posibilidades, determinadas por el peso molecular y la configuración espacial, tanto lineal como ramificada, de las cadenas de PEG utilizadas (144). Asimismo, la PEGilación impide la adsorción de opsoninas (anticuerpos) en las partículas, lo que aumenta su eficiencia de “invisibilidad”, reduciendo la inmunogenicidad, prolongando su tiempo de circulación y previniendo la agregación durante la circulación. Esto evita que las partículas sean identificadas como potenciales patógenos, lo que reduciría su eliminación por fagocitosis, aumentando así la probabilidad de que el fármaco llegue a su sitio de acción antes de ser reconocido como extraño y eliminado del cuerpo (127,136,139,140).

La estabilidad de las partículas también está influenciada por las características de su superficie, como la carga, la hidrofobicidad y los grupos funcionales. Por tanto, tres mecanismos principales contribuyen a su estabilidad coloidal: estabilización electrostática, estérica y por agotamiento. (145,146). La incorporación de lípidos catiónicos y/o polímeros como el PEG en la superficie de las nanopartículas permite aprovechar estos mecanismos de estabilización (Figura 17). El PEG, al ser un polímero hidrófilo, aumenta la superficie de contacto de las partículas al ser añadido en la matriz lipídica de las cSLNs, lo que contribuye a mantener su estabilidad (144).

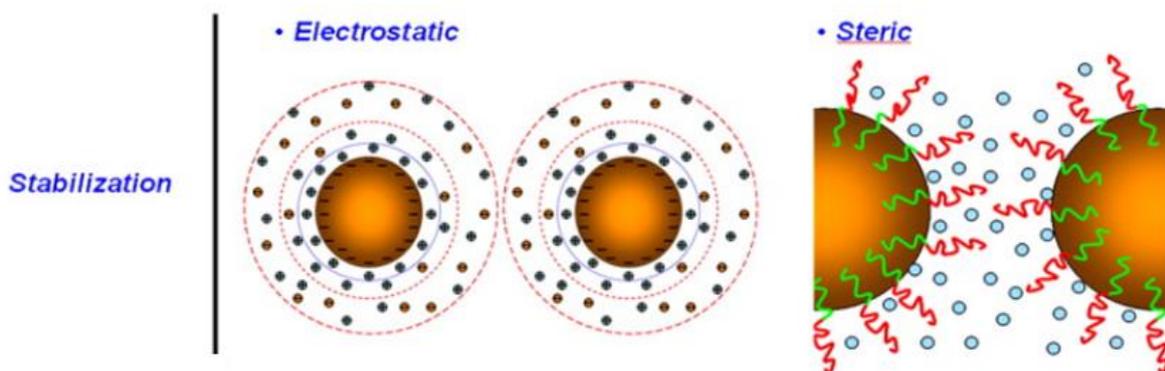


Figura 17. Esquema de los mecanismos de estabilidad coloidal que pueden presentar las nanopartículas (209).

La PEGilación, si bien puede mejorar la afinidad de las nanopartículas por las células endoteliales tumorales, también puede afectar la eficacia de la citotoxicidad en aplicaciones clínicas prolongadas. Una posible solución para abordar este desafío es la incorporación de ligandos específicos en la superficie de las nanopartículas, lo que podría dirigir las hacia receptores de membrana específicos y sitios de acción precisos (106). Sin embargo, el uso de PEG puede desencadenar efectos secundarios adversos en el organismo y generar cambios imprevistos en el comportamiento farmacocinético de los vehículos basados en este polímero. Además, las preocupaciones relacionadas con la hipersensibilidad, la degradación del PEG y la formación de productos secundarios tóxicos son importantes (140).

El exceso de PEG en la superficie puede afectar negativamente procesos celulares como la endocitosis, reduciendo la movilidad y la flexibilidad del polímero, lo que repercute en el tiempo de circulación en el organismo. A pesar de estos posibles inconvenientes, las propiedades positivas del PEG siguen siendo significativas. No obstante, la competencia en términos de patentes y comercialización está impulsando la búsqueda de polímeros alternativos (140,144). Es relevante tener en cuenta que, en comparación con el PEG, las alternativas aún carecen de suficientes estudios sobre biocompatibilidad, degradación bajo estrés y límites de excreción (147).

Por último, alineada con los intereses del grupo de investigación y partiendo de las formulaciones previamente establecidas de cSLN con colesteryl oleato (CO-cSLN), desarrolladas sin el empleo de solventes orgánicos y que han demostrado eficacia y seguridad tanto *in vitro* como *in vivo* (109,148,149), esta tesis doctoral realiza un análisis comparativo exhaustivo de varios excipientes PEGilados. El propósito es evaluar su impacto en las características fisicoquímicas de las CO-cSLNs para mejorar la formulación actual. Estos resultados buscan identificar la/s formulación/es más adecuada/s para la fabricación de nanopartículas PEGiladas con atributos óptimos, poniendo énfasis en el uso de excipientes económicos para reducir los costos de producción y garantizar la viabilidad de su escalado industrial. Este enfoque aborda una necesidad crítica en el campo de la nanotecnología biomédica.

1.7 LIOFILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Uno de los principales desafíos en farmacia galénica es lograr una adecuada estabilidad coloidal a lo largo del tiempo de las NPs, debido a su alta inestabilidad física y química (143,150). Para abordar este desafío, se utiliza principalmente la técnica de liofilización para mejorar su estabilidad, especialmente relevante ya que las formulaciones basadas

en NPs suelen presentarse como suspensiones líquidas y requieren condiciones de almacenamiento extremadamente frías para evitar la agregación y/o fusión de partículas, como en el caso de las vacunas contra la COVID-19, lo que limita su transporte y almacenamiento a largo plazo (151). La liofilización implica la deshidratación de una solución o suspensión mediante una congelación inicial, seguida del secado por sublimación del hielo sin pasar por una fase líquida intermedia, llevada a cabo bajo presión reducida (vacío). En el caso de una suspensión de NPs, tras completar la desecación, se obtienen NPs en forma de polvo seco, conformando una matriz seca fácil de manejar, transportar y almacenar (Figura 18) (152).



Figura 18. Conformación de las nanopartículas en los diferentes estados durante el proceso de liofilización (210).

1.7.1 ANTECEDENTES DE LA LIOFILIZACIÓN

Los principios de la liofilización ya eran conocidos y empleados por los incas, quienes los usaban para conservar patatas y secar carne congelada. Este método ancestral implicaba dejar que las patatas y la carne se congelaran durante la noche en las elevadas montañas de los Andes. Con los primeros rayos del sol de la mañana y la baja presión atmosférica de las montañas andinas, el agua congelada experimentaba sublimación, lo que se asemejaba a una forma de liofilización natural (124,152). Durante la Segunda Guerra Mundial, la liofilización se consolidó como un proceso industrial. Aunque en 1932 se construyó una planta de liofilización al vacío, no fue hasta después de 1940 que se utilizó como un método de conservación, con la liofilización del plasma sanguíneo y la penicilina. Esta consolidación como proceso industrial facilitó que estos productos llegaran en óptimas condiciones desde los centros de producción hasta el frente de batalla (152). Con la llegada de la carrera espacial, se requerían alimentos para los astronautas que fueran ligeros y mantuvieran sus propiedades organolépticas y nutricionales. Por esta razón, en la década de 1950 se perfeccionó la tecnología de liofilización y se aplicó a los alimentos. Hoy en día, la liofilización tiene innumerables aplicaciones y su desarrollo continúa progresando en diversas áreas, especialmente en medicina, productos farmacéuticos y cosméticos (124).

1.7.2 PROCESO DE LA LIOFILIZACIÓN

Como se mencionó previamente, el proceso de liofilización tiene como objetivo separar el solvente de una disolución mediante congelación y posterior sublimación, llevado a cabo en condiciones de vacío y baja temperatura. La sublimación es el proceso físico en el cual una sustancia pasa directamente del estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido (Figura 19). Para que ocurra este cambio de estado, la sublimación debe realizarse a una presión inferior a la presión de vapor del líquido, manteniendo constante la temperatura dentro del liofilizador (153,154). Durante este proceso, los alimentos y materiales biológicos se convierten en productos secos mediante deshidratación bajo presión reducida (vacío), lo que evita la transición a la fase líquida y preserva sus propiedades. Esto permite que la materia orgánica mantenga su integridad sin experimentar cambios enzimáticos, químicos o biológicos, ya que permanece congelada durante el secado (85,155).

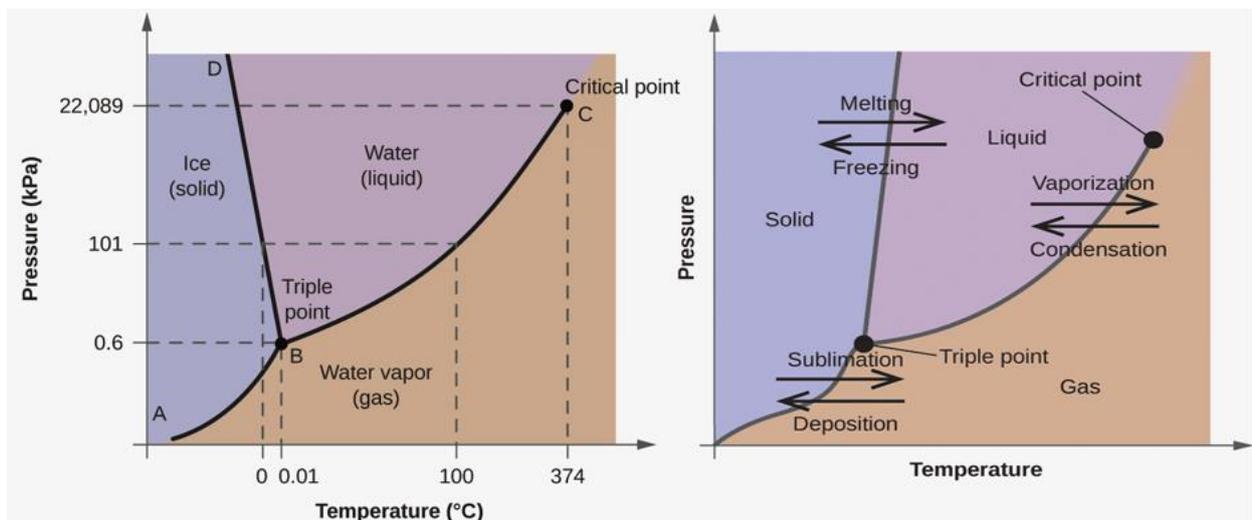


Figura 19. Representación del estado físico de un sistema. La sublimación puede ocurrir por debajo de la temperatura y presión del punto triple. El ejemplo corresponde a la gráfica del agua (211).

La liofilización se lleva a cabo en equipos especializados y consta de tres etapas principales: congelación (solidificación), secado primario (sublimación del hielo) y secado secundario (desorción de agua no congelada; Figura 20). Inicialmente, el producto se dispone en viales o en bandejas sobre las placas de la cámara del liofilizador, donde se colocan sensores de temperatura. Luego, se reduce la temperatura de las placas para congelar completamente el producto y lograr su solidificación. Paralelamente, el serpentín del condensador se enfría para recibir los vapores de agua liberados por el producto. Se activa la bomba de vacío para reducir la presión en el sistema durante todo el proceso. Una vez que la presión en la cámara alcanza niveles

adecuados, comienza la sublimación del hielo, dando el inicio del secado primario. Durante esta etapa, se aplica calor a las placas de la cámara para compensar el consumo de energía. Cuando todo el hielo ha sido sublimado, inicia el secado secundario para eliminar la humedad residual (124,153).

A continuación, se detalla cada una de las etapas que componen el proceso de liofilización:

- **Congelación:** Es el primer paso previo al proceso de liofilización, realizado a bajas temperaturas (de la escala de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$) de forma rápida para evitar rupturas estructurales debido a cristales de hielo grandes. La congelación de un producto es tan crítica como el secado en el proceso de liofilización. Durante esta etapa, se generan tensiones que afectan la estabilidad de las NPs, desde la formación de cristales hasta efectos interfaciales, concentración por congelación, cambio de pH del tampón y separación de fases (156). El proceso comienza estableciendo la temperatura de congelación una vez que se han colocado todos los viales con las muestras. La muestra se enfría hasta que se produce la nucleación del hielo, que ocurre varios grados por debajo del punto de congelación de equilibrio de la muestra, fenómeno conocido como superenfriamiento (*supercooling*). Posteriormente, los cristales comienzan a crecer, lo que lleva a la congelación de la muestra, que continúa hasta alcanzar la temperatura de transición vítrea (T_g). Para asegurar la solidificación completa, la muestra debe congelarse por debajo de T_g , dependiendo de si la muestra está en estado amorfo o cristalino. El estrés durante esta etapa puede desestabilizar las NPs, por lo que se deben incorporar excipientes especiales (crioprotectores y/o lioprotectores) en la formulación para protegerlas antes y durante la liofilización (80,153). La velocidad de congelación determina el tamaño de los cristales de hielo, siendo la congelación rápida la que produce cristales de hielo más pequeños, lo que afecta la magnitud de la tensión mecánica y el tiempo de residencia en la fase crioconcentrada.
- **Secado primario:** En esta etapa, se extrae la mayor parte de agua del producto mediante sublimación. El proceso se inicia al reducir la presión en la cámara y aumentar la temperatura de las placas, lo que provoca la eliminación del calor generado por la sublimación del hielo. Es fundamental mantener la presión por debajo del nivel de la presión de vapor de hielo para garantizar una velocidad de transferencia de calor adecuada al producto. Una presión demasiado baja puede limitar esta transferencia. El hielo se elimina por sublimación del producto y se transfiere al condensador, donde el vapor de agua se retiene sobre placas frías

mediante cristalización. La energía necesaria para la transición de fase se controla ajustando la temperatura de las placas. Dado que la entrada de energía se consume en la sublimación, la temperatura del producto resultante es mucho menor que la de la placa. Un análisis del balance de energía demostró que la mayoría de las pérdidas energéticas ocurren durante esta etapa, seguidas por las asociadas con el condensador y el sistema de vacío (124,153). El secado primario finaliza cuando la temperatura del producto se aproxima a la temperatura del estante.

- **Secado secundario:** La matriz seca producida por el secado primario aún retiene una pequeña cantidad de agua no congelable, que debe eliminarse mediante desorción a temperaturas más elevadas, generalmente entre 20–40 °C. Para evitar el colapso de la matriz, no se debe aumentar la temperatura del producto hasta que se haya eliminado todo el hielo. Dado que el contenido de humedad residual al final del secado primario puede llegar hasta un 30%, un aumento rápido en la temperatura de las placas podría elevar la temperatura del producto por encima de su temperatura de colapso (T_c). Por ende, es relevante conocer con precisión la T_c para evitar el colapso de la matriz y asegurar un secado adecuado y estandarizado. Esta temperatura es única para cada formulación y se define como la máxima temperatura que la estructura molecular puede tolerar sin perder su integridad, en condiciones específicas de vacío (153,157).

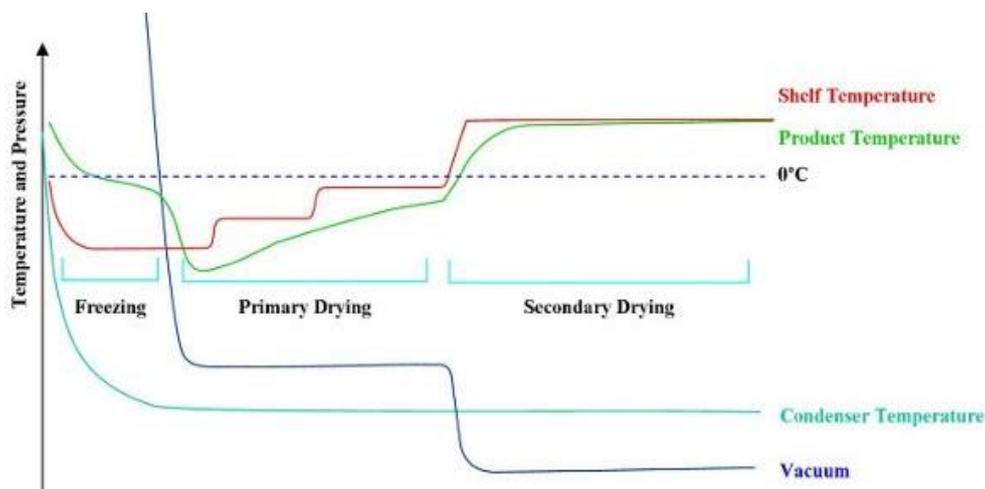


Figura 20. Esquema de un ciclo típico de liofilización (212).

1.7.3 MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE CALOR

La transferencia de calor desde la fuente de calor al producto para remover el agua se realiza mediante conducción, convección y/o radiación (Figura 21). Estos mecanismos se describen a continuación:

- **Conducción:** Este método de transmisión de calor implica calentar el producto mediante el contacto directo entre fases sólidas, ya sea desde el interior o entre placas. El calor proviene del fluido térmico que calienta la superficie de las placas o directamente la base del vial que está en contacto directo con el producto. Por lo tanto, la eficiencia de la conducción está estrechamente relacionada con el diseño del equipo y la geometría de los recipientes utilizados, lo que resalta la importancia de caracterizar este fenómeno mediante la definición del coeficiente de transferencia de calor (157).
- **Convección:** Este proceso implica la transferencia de calor mediante la circulación de moléculas de gas dentro de las fases de vapor, debido a la difusión browniana y la colisión molecular presentes en el espacio cerrado de la cámara del liofilizador. Aunque se considera que la influencia de este mecanismo de transferencia es insignificante en comparación con los otros mecanismos, es elemental tenerlo en cuenta en el proceso (155,157).
- **Radiación:** Este método constituye otro aspecto clave en la transmisión de calor, proveniente de varias superficies dentro del liofilizador, como las placas superior e inferior en contacto con el recipiente, las cuatro paredes de la cámara, las mirillas de visión de los laterales del cuerpo del liofilizador, entre otros. Estas superficies irradian calor desde la parte superior e inferior, y lo crítico de esta etapa del proceso radica en la diferencia entre la temperatura del producto y la de los elementos emisores del equipo (157).

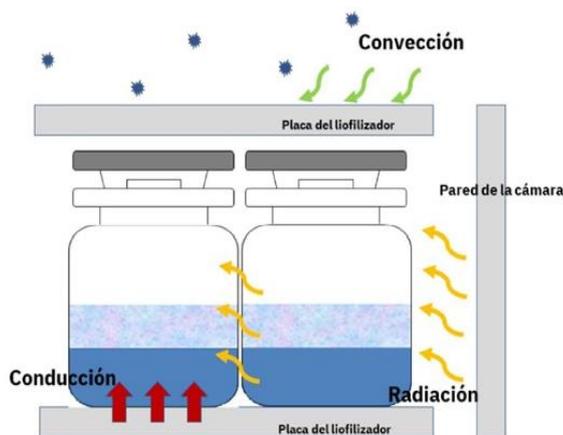


Figura 21. Mecanismos de transferencia de calor durante el proceso de liofilización (157).

1.7.4 CRIOPROTECTORES

El uso de lio y/o crioprotectores es determinante para garantizar la protección de las nanopartículas durante el paso agresivo de congelación (Figura 22) y secado que tiene el proceso (158). La temperatura de transición vítrea (T_g) es un parámetro crucial que debe considerarse para mantener la integridad de las partículas antes de la liofilización (159). Estos factores deben tenerse en cuenta para obtener resultados de alta calidad después del proceso de liofilización. La estabilidad de las NPs depende principalmente de la estabilidad fisicoquímica de los lípidos sólidos que las componen, ya que son más susceptibles a la degradación y a la coalescencia. Estos compuestos desempeñan diversas funciones como la crioprotección, la modificación de la temperatura de colapso, actúan como agentes de carga y facilitan la reconstitución del producto final. Estos crioprotectores mejoran las características del producto durante la liofilización y/o almacenamiento, a menudo cumpliendo múltiples funciones simultáneamente (124,155).

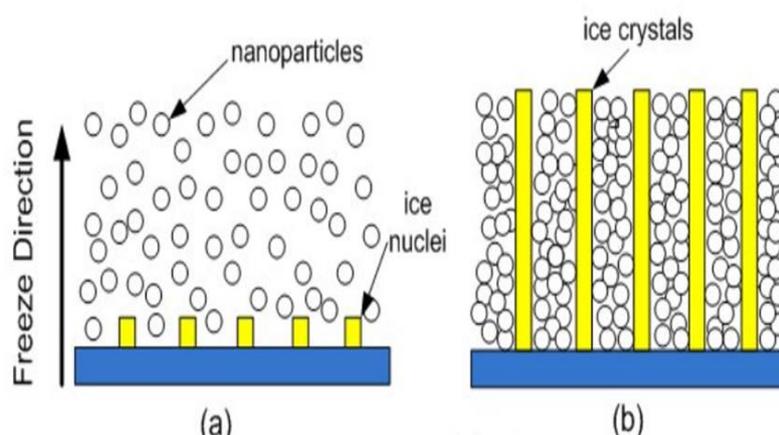


Figura 22. Esquema del efecto de la congelación sobre las nanopartículas (213).

La adición de un azúcar (sacarosa, trehalosa o manitol) como lio y/o crioprotector se considera uno de los parámetros más importantes para preservar el tamaño de las partículas y la retención de la carga útil, mejorando la estabilidad de las NPs durante todo el proceso de liofilización (Figura 23). Se prefieren los disacáridos (trehalosa, sacarosa) sobre los mono o trisacáridos debido a sus T_g más altas, aunque pueden inducir citotoxicidad y/o efectos no deseados. Además, la adición de azúcares puede prevenir una transición de fase después de la rehidratación (156).

La elección de un lio y/o crioprotector adecuado es de suma importancia, dado su impacto en la estabilidad de las NPs. Es esencial considerar los parámetros específicos,

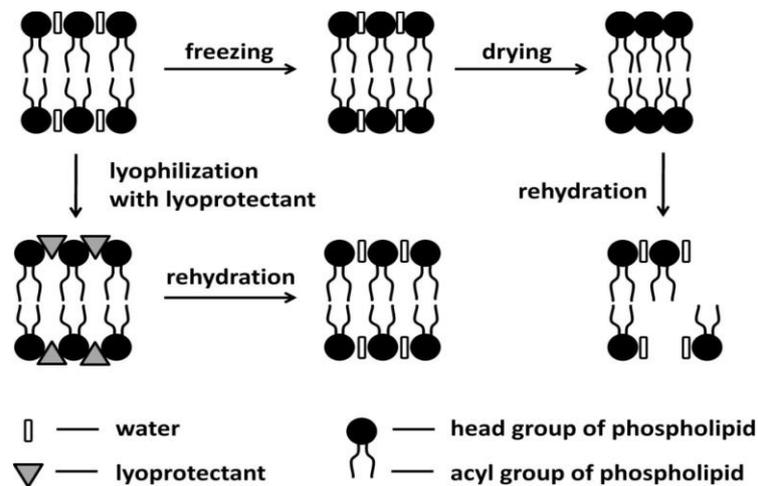


Figura 23. Mecanismo de reposición de agua durante la liofilización y rehidratación de bicapas lipídicas (156).

como la temperatura crítica y la formulación y diseño de las NPs. Si bien el éxito de la liofilización de NPs está influenciado principalmente por el tipo de NPs y los factores de formulación, no se deben subestimar los factores del proceso, dada su complejidad y costos asociados. No obstante, para varios productos farmacéuticos, la liofilización representa la única manera de preservar sus cualidades originales durante un tiempo aceptable a temperaturas ambiente y superiores (152,156). Por último, si bien el proceso de liofilización puede considerarse menos crítico en comparación con los aspectos de formulación, no debe descuidarse durante el desarrollo del proceso. La selección de excipientes apropiados antes de la liofilización resulta importante, ya que se espera que los factores de formulación desempeñen un papel clave en la estabilización del producto durante todo el proceso de liofilización, almacenamiento y posterior reconstitución (156).

1.7.5 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA LIOFILIZACIÓN

El éxito de una correcta liofilización de las NPs se fundamenta en varios aspectos cruciales como la fácil y completa resuspensión del liofilizado, el mantenimiento de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas, así como la estabilidad a largo plazo del producto. Es importante que un producto liofilizado presente una degradación mínima. Entre las ventajas más distinguidas del proceso de liofilización se encuentra su operación en un entorno altamente controlado, lo que reduce significativamente el riesgo de contaminación. Además, este método aumenta la estabilidad física y química de las NPs, ya que se secan sin calentamiento excesivo, preservando eficazmente los materiales que de otro modo podrían desnaturalizarse sin pérdida de actividad. Los productos liofilizados poseen una superficie considerable, lo que facilita su rápida reconstitución. Asimismo, al estar completamente secos, son más ligeros, lo que reduce

los costos de transporte. Es fundamental resaltar que la liofilización es una de las técnicas de conservación que no requiere aditivos (124,153,154).

Por otro lado, la liofilización presenta una serie de desafíos, entre los que se incluyen el prolongado tiempo necesario para el secado, la baja eficiencia energética y, por tanto, el alto costo energético, así como la considerable inversión requerida tanto para la adquisición como en el mantenimiento de equipos. Además, los productos liofilizados son particularmente sensibles a la congelación y otras tensiones asociadas al proceso, lo que aumenta su complejidad. Para llevar a cabo este proceso de manera efectiva, se requiere un estricto control de las variables técnicas y la incorporación de excipientes crio/lioprotectores (151,154).

Aunque la liofilización se considera un método suave para deshidratar tanto compuestos orgánicos como inorgánicos sin afectar significativamente su composición cualitativa o cuantitativa, puede generar tensiones que provocan inestabilidad física. Estas tensiones incluyen la congelación, deshidratación, agregación, fusión o fuga de contenido (153,156). La complejidad del proceso de liofilización, con su alto número de parámetros a controlar, junto con el desarrollo de NPs, presentan desafíos adicionales debido a la falta de reglas universales y la baja estabilidad coloidal que tienen las NPs. El ciclo de liofilización puede inducir la aglomeración de las NPs a causa del estrés irreversible provocado por la congelación y el secado (145), lo que afecta sus propiedades fisicoquímicas, como el tamaño de partícula (PSD) y el índice de polidispersidad (Pdl) (156,160). Para minimizar estos efectos, es esencial establecer correctamente los parámetros del proceso de liofilización, tales como temperatura, vacío y duración del proceso, con el fin de evitar la agregación de nanopartículas (145) y lograr establecer una receta óptima, reproducible y exitosa.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS

Considerando los precedentes establecidos por los anteriores doctorandos del grupo de investigación, vinculados a la presente tesis doctoral, se plantean los siguientes objetivos principales, acompañados de sus respectivos objetivos específicos:

1. Desarrollar nuevas formulaciones añadiendo excipientes PEGilados a cSLNs con colesteril oleato que sean altamente eficaces y reproducibles, siendo también económicamente viables y con un sistema de fabricación sencillo y fácilmente escalable.
2. Determinar el impacto de la PEGilación en las características fisicoquímicas, morfológicas y biológicas de las diferentes formulaciones desarrolladas, tanto en suspensión acuosa sin liofilizar como liofilizadas.
3. Estudiar el efecto de la PEGilación en el transporte y vehiculización del ADN/ARN utilizando las PEG-cSLNs desarrolladas, tanto en suspensión acuosa sin liofilizar como después de la liofilización, con el fin de lograr una eficiente transfección. Este objetivo abarca varios subobjetivos que se detallan a continuación:
 - Realizar estudios de viabilidad celular para evaluar el impacto de las diferentes PEG-cSLNs en la muerte y el metabolismo celular en cultivos *in vitro*.
 - Llevar a cabo estudios de formación de complejos entre las PEG-cSLNs y ADN/ARN utilizando diferentes ratios de SLNs:ADN/ARN.
 - Determinar el porcentaje de eficiencia de transfección mediante la vehiculización del plásmido que codifica para la expresión de la enzima luciferasa.
4. Estudio, mejora y optimización del proceso de fabricación para desarrollar una o varias formulaciones de PEG-cSLN con los atributos críticos de calidad deseados y que sean estables en el tiempo. Este objetivo se divide en varios subobjetivos que se detallan a continuación:
 - Estudio e investigación de mecanismos físicos y químicos para reducir el tamaño de partícula y optimizar el proceso de fabricación de las PEG-cSLNs.
 - Estudiar y optimizar el proceso de liofilización mediante el empleo de rampas

de temperatura, ajuste del vacío y duración del proceso, así como determinar el crioprotector adecuado con su concentración óptima para garantizar la obtención de un producto liofilizado de alta calidad.

- Evaluar la estabilidad de las PEG-cSLNs, tanto en suspensión acuosa sin liofilizar como liofilizada, bajo diversas condiciones de almacenamiento, siguiendo las directrices del ICH.
- Seleccionar la/s mejor/es formulación/es de SLNs que incorporen el mejor tipo de PEG en las proporciones óptimas para poder continuar con las siguientes fases de la investigación.

**PARTE
EXPERIMENTAL**

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Los materiales, reactivos y equipos utilizados en esta tesis se clasificarán en dos grandes secciones: la parte galénica y la parte biológica.

3.1.1 SECCIÓN GALÉNICA

Materiales:

- Vasos de precipitación de diferentes volúmenes (5 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL)
- Probetas (50 mL y 100 mL)
- Embudos
- Vidrio reloj
- Viales de vidrio (Tipo II) 5 mL
- Tapones elastoméricos
- Espátula-cuchara
- Micro espátulas
- Bandejas de pesaje
- Pipetas pasteur
- Tubos para centrifuga
- Soporte universal
- Pinzas doble nuez
- Termómetro
- Jeringa BD 10 mL
- Filtros de jeringa
- Papel Parafilm
- Papel filtro de 43–48 μm (FilterLab®, España)
- Papel filtro de 7–9 μm (FilterLab®, España)
- Cubetas para espectrofotometría Kartell™ (0196100)
- Celda capilar plegada desechable (DTS1070)
- Rejilla TEM (grids) de cobre con película de carbono
- Micropipeta Eppendorf 100–1000 μL
- Micropipeta Eppendorf 20–200 μL
- Puntas azules 100–1000 μL
- Puntas amarillas 20–200 μL
- Viales con PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar
- Viales con PEG-cSLNs liofilizadas
- Viales con PEG-cSLNs y cistamina suspendidas en medio acuoso sin liofilizar

Excipientes y Reactivos:

- Ácido esteárico (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)
- Colesteril Oleato (Tokyo Chemical Industry Co., Tokyo, Japón)
- Polyoxyethylene (100) stearyl ether- PEG100SE (Brij S100, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA)
- 1,2-distearoyl-phosphatidylethanolaminemethyl-polyethyleneglycol conjugate-2000 (DSPE-mPEG2000, Muse Chem, Fairfield, NJ, USA)
- PEG-32 hydrogenated palm glycerides (Gelucire 50/13, Gattefossé SAS, Saint-Priest, Francia)
- Polyoxyethylene (40) stearate-PEG 40 monostearate (Myrj 52, Sigma-Aldrich Co.)
- Polyoxyethylene (100) stearate-PEG100S (Myrj S100, Croda Iberica S.A., Fogars de la Selva, España)
- Polyoxylethylene stearates- glycol stearate PEG-6 stearate PEG-32 stearate (Tefose 63, Gattefossé SAS)
- Polyoxylethylene stearates- PEG-6 stearate PEG-32 stearate (Tefose 1500, Gattefossé SAS)
- Octadecilamina (Acros Organics, Geel, Belgium)

- Poloxamer 188 (Sigma-Aldrich Co.)
- Acetato de uranilo 4%
- Metil celulosa 4 %
- Trehalosa (C*Ascend 16400, Cerestar, Malinas, Bélgica)
- Sacarosa (Fagron, Terrassa, España)
- Sucralosa (Fagron)
- Diclorhidrato de cistamina (Sigma-Aldrich Co.)
- Etanol absoluto
- Agua MiliQ (EMD Millipore)

Equipos:

- Balanza analítica Dual Range XS105 (Mettler-Toledo, Suiza)
- Balanza de precisión PJ300 (Mettler-Toledo, Suiza)
- Agitador magnético MR Hei-Tec con calefacción (Heidolph™, Alemania)
- Ultra-Turrax Digital IKA® T-25, con un rotor S25N-8G (IKA, Alemania)
- Centrífuga Digen 20-R (OrtoAlresa, España)
- Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical Ltd, UK)
- Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments, UK)
- Microscopio electrónico de transmisión (TEM) Tecnai Spirit Spirit 120 kV. equipado con un cátodo LaB6 (FEI Company, Hillsboro, OR, USA)
- Calorímetro DSC-822e (Mettler-Toledo, Suiza)
- Liofilizador LyoLab C85 20 (Coolvacuum, Barcelona, SPAIN)
- Nevera Multi Air Flow GR-389SQA (LG)

3.1.2 SECCIÓN BIOLÓGICA

Materiales:

- | | |
|---|---------------------------------------|
| ○ Vasos de precipitación de 50 y 100 mL | ○ Micropipeta Eppendorf 100–1000 µL |
| ○ Probetas (50 mL y 100 mL) | ○ Micropipeta Eppendorf 20–200 µL |
| ○ Espátula-cuchara | ○ Micropipeta Eppendorf 0.1–10 µL |
| ○ Embudos | ○ Puntas azules 100–1000 µL |
| ○ Micro espátulas | ○ Puntas amarillas 20–200 µL |
| ○ Bandejas de pesaje | ○ Puntas blancas 0.1–10 µL |
| ○ Pipetas pasteur | ○ Tubos Eppendorf (0.2, 0.5 y 1.5 mL) |
| ○ Papel filtro de 43–48 µm (FilterLab®, España) | ○ Placas M6 de 35 mm (Falcon) |
| ○ Tapones elastoméricos | ○ Placas P100 (Falcon) |

- Tubos para centrífuga
- Soporte universal
- Pinzas doble nuez
- Termómetro
- Jeringa BD 10 mL
- Viales con PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar
- Viales con PEG-cSLNs liofilizadas
- Viales con PEG-cSLNs y cistamina suspendidas en medio acuoso sin liofilizar

Reactivos y línea celular:

- Células HEK293T: células epiteliales humanas embrionarias de riñón
- Medio Low Glucose: Gibco DMEM (1X) (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- Suero bovino fetal (FBS) GIBCO® (Life Technologies)
- 0.25% Trypsin-EDTA (1X) GIBCO®
- L-Glutamine 200 mM (100X) GIBCO®
- Pen Strep (Pencilin Streptomycin) GIBCO®
- MEM NEAA (100X) (Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids) GIBCO®
- Tampón fosfato salino (PBS) 10X GIBCO® (Life Technologies)
- Solución de peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich Co.)
- Yoduro de propidio (Sigma-Aldrich Co.)
- Plásmido luciferasa MHC (5400 bp)
- Agarosa ITM Biotechnology Grade (VWR Life Science)
- RedSafe™ 20.000X (INTRON Biotechnology)
- Tampón de carga con azul de bromofenol preparado en el laboratorio
- Kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega Corporation)

Equipos:

- Cabina de flujo laminar EuroAire TDI, Modelo CSB120
- Centrífuga Eppendorf Centrifuge 5810R
- Incubador ThermoForma, Modelo 311
- Centrífuga 5415R (Eppendorf)
- Ultracongelador Forma-86C ULT Freezer (Thermo Electron Corporation)
- VersaMax™ Microplate Reader (BioNova científica S.L.)
- Microscopio óptico con cámara acoplada
- Citómetro FACSCalibur (BD Biosciences)
- Cubeta de electroforesis
- Transiluminador UV Gel Doc™ EZ Imager (BioRad)
- Luminómetro FB12 (Berthold Detection Systems)

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 SECCIÓN GALÉNICA

3.2.1.1 Fabricación de las PEG-cSLNs

Las PEG-cSLNs se fabricaron utilizando el método de microemulsificación caliente (*Hot Microemulsification Method*), previamente descrito (128) y detallado ampliamente en la sección 1.4.2.7. Brevemente, esta técnica implica la preparación de una emulsión *-oil in water-* (O/W) mediante ultra agitación de la fase lipídica sobre la fase acuosa. La formación de las nanopartículas ocurre al aplicar un shock térmico, vertiendo la emulsión caliente en agua fría.

Para el desarrollo de esta tesis doctoral, la fase lipídica consiste en una combinación del componente PEG, ácido esteárico y colesteril oleato. Estos tres componentes son pesados en una balanza analítica según las cantidades calculadas para cada prueba, sumando un total de 500 mg (Anexo III, Tabla S1) y se colocaron en un vaso de precipitados de 5 mL (fase lipídica o dispersa). Estos excipientes se calientan a 80 °C para su fusión. Es esencial que los lípidos seleccionados tengan puntos de fusión inferiores al punto de ebullición del agua, ya que la técnica se realiza en caliente, manteniendo la temperatura 10 °C por encima del punto de fusión de los excipientes. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se llevó a cabo un estudio para determinar la cantidad óptima de PEG a añadir, por lo que se realizó un estudio factorial con los tres componentes de la fase lipídica (Sección 4.1.1.1). Tras una detallada revisión bibliográfica (136,161–163), se seleccionaron cinco excipientes PEGilados diferentes (Brij S100, DSPE-mPEG2000, Gelucire 50/13, Myrj 52 y Myrj S100) en base a sus características moleculares y de solubilidad, estudios de carácter hidrófilo-lipófilo, compatibilidad teórica y experimental entre los componentes, así como el costo de cada uno de los excipientes PEGilados.

Se pesan 600 mg de octadecilamina y 100 mg de poloxamer 188 en la balanza analítica, mientras se calienta otro vaso de precipitados de 50 mL conteniendo 20 mL de agua MilliQ a 80 °C. Una vez la temperatura del agua alcanzó entre 75–80 °C, se añaden la octadecilamina y el poloxamer 188, dispersándose en el agua durante 5 min (fase acuosa o continua). Posteriormente, se vierte la fase lipídica sobre la solución acuosa para formar la emulsión caliente, una vez que los lípidos de la fase dispersa se funden y los excipientes de la fase continua se disuelven. Después de la mezcla de las dos fases, la emulsión se somete a ultra agitación (20000 rpm) utilizando un Ultra-Turrax Digital durante 10 min, manteniendo la temperatura alrededor de los 80 °C. Luego, la

microemulsión resultante se vierte sobre un vaso conteniendo 125 mL de agua MilliQ fría (1–4 °C) y se somete nuevamente a ultra agitación con las mismas condiciones previamente mencionadas. Este paso es crucial para solidificar la matriz lipídica y formar las PEG-cSLNs. La microemulsión final se centrifuga a 19000 x g a 4 °C durante 20 min para eliminar cualquier exceso residual. Finalmente, la nanosuspensión se filtró dos veces a través de filtros 43–48 µm y 7–9 µm respectivamente, y se distribuye en viales de vidrio tipo II de 5 mL con tapón elastomérico y encapsulados, almacenándose a 4 °C hasta el proceso de liofilización.

3.2.1.2 Liofilización de las PEG-cSLNs

3.2.1.2.1 Temperatura de Transición Vítrea (T_g)

Una vez fabricadas las PEG-cSLNs, se procede a su liofilización. Es relevante determinar la temperatura de transición vítrea de las distintas formulaciones PEGiladas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) antes de liofilizar las nanopartículas para establecer los parámetros apropiados del proceso. El DSC, una técnica común de análisis térmico registra los cambios en la entalpía de las muestras en función del tiempo o la temperatura, lo que facilita la evaluación de sus propiedades químicas y física. Además, permite identificar las capacidades caloríficas específicas y los cambios en la capacidad calorífica, incluyendo transiciones vítreas, mediante la diferencia en el flujo de calor (164,165).

El DSC se emplea para determinar la temperatura crítica de colapso (T_c) en sustancias cristalinas, mientras que, para sustancias amorfas como las nanoemulsiones, se emplea el concepto de temperatura de transición vítrea (T_g). Para determinar la T_g, las muestras se congelaron desde 25 °C hasta -80 °C a una velocidad de 10 °C/min y se mantuvieron a -80 °C durante 1 min antes de calentarlas nuevamente hasta 25 °C, con la misma velocidad de calentamiento. La identificación de un pico exotérmico en la curva de la DSC indica la temperatura crítica de colapso, señalando la temperatura por debajo de la cual se debe operar en el secado primario durante la liofilización.

3.2.1.2.2 Liofilización

Basándonos en las T_gs obtenidas de las distintas formulaciones, se procedió a liofilizar las PEG-cSLNs. Como se explica en detalle en la sección 1.7, la liofilización es un proceso ampliamente utilizado para secar compuestos orgánicos o inorgánicos sin alterar su composición (155,156). Este proceso logra la separación del solvente de una disolución mediante congelación y sublimación, realizándose con vacío y a baja

temperatura, operando bajo condiciones de presión y temperatura inferiores a la temperatura crítica de colapso, la cual es específica de cada sistema y cuya determinación es relevante para poder obtener un liofilizado adecuado.

El liofilizador, compuesto por la cámara de liofilización y la de condensación, está equipado con componentes esenciales, como el sistema de refrigeración para enfriar el condensador y las muestras, la bomba de vacío para crear el vacío requerido, el sistema de control que supervisa y ajusta la temperatura y presión, y el sistema de bandejas donde se coloca el producto a liofilizar (Figura 24). El proceso de liofilización sigue una secuencia general que incluye la carga de muestras, la congelación a 10–15 °C por debajo de la T_c para lograr la solidificación completa del producto, el secado primario (sublimación), que se da cuando la presión alcanza niveles suficientemente bajos para permitir la sublimación del hielo, siendo esta etapa generalmente la más prolongada. Luego sigue el secado secundario (desorción), cuando todo el hielo se ha sublimado para eliminar la humedad residual, seguido por el posible cierre de viales y la descarga de las muestras. Este ciclo, que suele durar entre 24–72 horas, comienza con la congelación cercana a -40 °C. A medida que transcurre el tiempo, la temperatura del producto aumenta gradualmente, indicando la reducción del hielo disponible para sublimar. La etapa de secado primario finaliza cuando comienza el secado secundario, caracterizado por una notable disminución del vacío, un aumento de temperatura en las bandejas y una evaporación residual de hielo (aproximadamente un 0.5%). El proceso concluye cuando las temperaturas del producto y las bandejas se igualan (154,166).

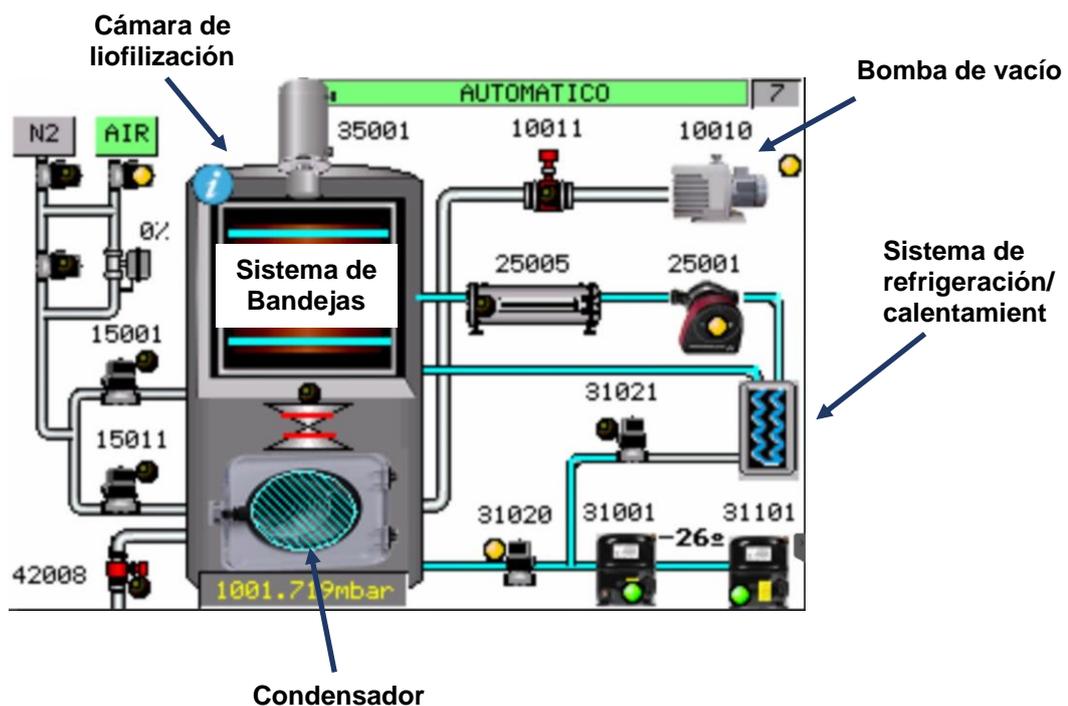


Figura 24. Esquema del liofilizador LyoLab C85 20 y sus componentes principales.

En esta tesis doctoral, cinco formulaciones diferentes de PEG-cSLNs (Brij S100, Gelucire, DSPE, Myrj 52 y Myrj S100) fueron liofilizadas inicialmente utilizando una solución de trehalosa al 5% (p/v) como crioprotector. El proceso se llevó a cabo en un liofilizador LyoLab C85 20, donde se colocaron los viales de vidrio con las muestras (~200) en las bandejas del equipo. Cada vial contenía cuatro mililitros de solución (2 mL de PEG-cSLNs en suspensión con 2 mL de solución de trehalosa al 5%) por cada una de las cinco formulaciones diferentes de nanopartículas PEGiladas (~40 viales por formulación). El ciclo de liofilización empleado consistió en congelar los viales a -55 °C durante 2 h, seguido de un secado primario donde la temperatura aumentó a -15 °C con un vacío de 0.30 mbar durante 20 h, y un secado secundario a 25 °C durante 20 h (receta convencional). Es relevante resaltar que cada vial debe tener tapones elastoméricos específicos semi-tapados para permitir la salida del vapor del solvente por sublimación. Cabe recalcar que a lo largo de la tesis diferentes crioprotectores y distintos parámetros de proceso fueron estudiados con tal de mejorar y optimizar el proceso de liofilización.

3.2.1.3 Caracterización Físicoquímica y Morfológica de las PEG-cSLNs

Se analizaron las propiedades físicoquímicas tanto de nanopartículas suspendidas en medio acuoso sin liofilizar como liofilizadas, siendo estas últimas reconstituidas con 4 mL de agua MiliQ.

3.2.1.3.1 Determinación del Tamaño de Partícula

La determinación del tamaño de partícula, sobre todo su distribución dentro de la muestra analizada (*Particle Size Distribution*; PSD), así como el índice de polidispersión (Pdl), se determinaron utilizando dispersión dinámica de la luz-*dynamic light scattering* (DLS)-con un Zetasizer Nano ZS90. Esta técnica examina el diámetro hidrodinámico de las partículas (*z-average*), proporcionando diámetros volumétricos medios. La DLS es una técnica estable y precisa para caracterizar el tamaño de partículas en suspensiones y emulsiones, basada en el movimiento browniano de las partículas en solución. Este movimiento de partículas se produce debido a la colisión aleatoria con las moléculas del líquido que las rodea: las partículas más pequeñas se mueven más rápido, mientras que las más grandes se mueven más lentamente (Figura 25). La luz dispersada por las partículas proporciona información sobre la velocidad de difusión, lo que se correlaciona con la distribución de tamaños (PSD). A partir del tamaño medio, se puede estimar el peso molecular utilizando el software proporcionado, que mide la velocidad de fluctuación de intensidad para calcular el tamaño de las partículas (167,168).

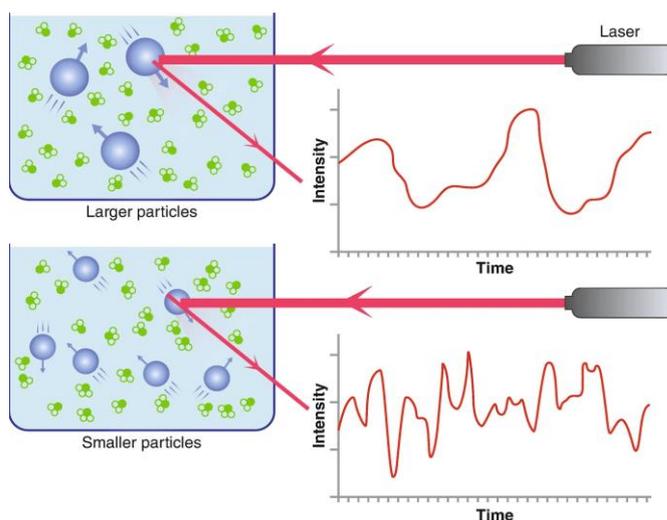


Figura 25. Dispersión dinámica de luz en dos muestras: partículas grandes en la parte superior y partículas pequeñas en la parte inferior (214).

Todas las muestras se midieron por triplicado para obtener la distribución promedio del tamaño de las nanopartículas y la desviación estándar, expresada en nanómetros (nm). Las formulaciones de nanopartículas suspendidas en solución acuosa sin liofilizar se caracterizaron el mismo día de fabricación, mientras que las PEG-cSLNs liofilizadas se almacenaron a 4 °C hasta continuar con los análisis posteriores. Las mediciones se realizaron a 25 °C y se analizaron utilizando el software de uso general, especificando el tipo de partícula y dispersante utilizado.

3.2.1.3.2 Análisis del Potencial Z

La carga superficial de todas las formulaciones (PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar y reconstituidas liofilizadas) se midió mediante electroforesis Doppler por láser utilizando un Zetasizer Nano-Z. Este sistema determina el potencial zeta (ZP) al analizar la movilidad electroforética de las partículas bajo un campo eléctrico, seguido de la aplicación de la ecuación de Henry. La movilidad electroforética se obtiene a través de un ensayo de electroforesis en la muestra, donde se mide la velocidad de las partículas mediante la velocimetría por láser Doppler (LDV), una técnica ampliamente establecida para estudiar el flujo de fluidos en diversas situaciones, incluida la velocidad de partículas diminutas en fluidos en movimiento. En otras palabras, se mide directamente la movilidad electroforética y luego se convierte en el potencial zeta mediante consideraciones teóricas relacionadas con la ecuación de Henry, utilizando un software especializado. La esencia de un sistema de microelectroforesis convencional radica en una celda capilar que contiene electrodos en ambos extremos, los cuales son sometidos a un potencia eléctrico. Las partículas se desplazan hacia el electrodo de carga opuesta,

y su velocidad se mide y expresa en intensidad de campo unitaria como su movilidad (168).

La presencia de una carga neta en la superficie de la partícula altera la distribución de iones en la región interfacial adyacente, generando una mayor concentración de contraiones (iones de carga opuesta) cerca de la superficie y facilita la formación de una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula (Figura 26). Esta capa líquida consta de dos partes: una región interna (capa compacta), donde los iones están fuertemente unidos, y una región externa, difusa, donde la unión es menos fuerte. Dentro de la capa difusa, existe un límite teórico donde los iones y las partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la gravedad), los iones dentro de este límite se mueven con ella, mientras que los iones más allá del límite no la acompañan. Este límite se conoce como superficie de corte hidrodinámico, y el potencial en este límite se denomina potencial zeta (168). Para determinar el potencial Z, se realizaron mediciones por triplicado, las muestras se estabilizaron a 25 °C antes de la medición y los resultados se expresaron en milivoltios (mV).

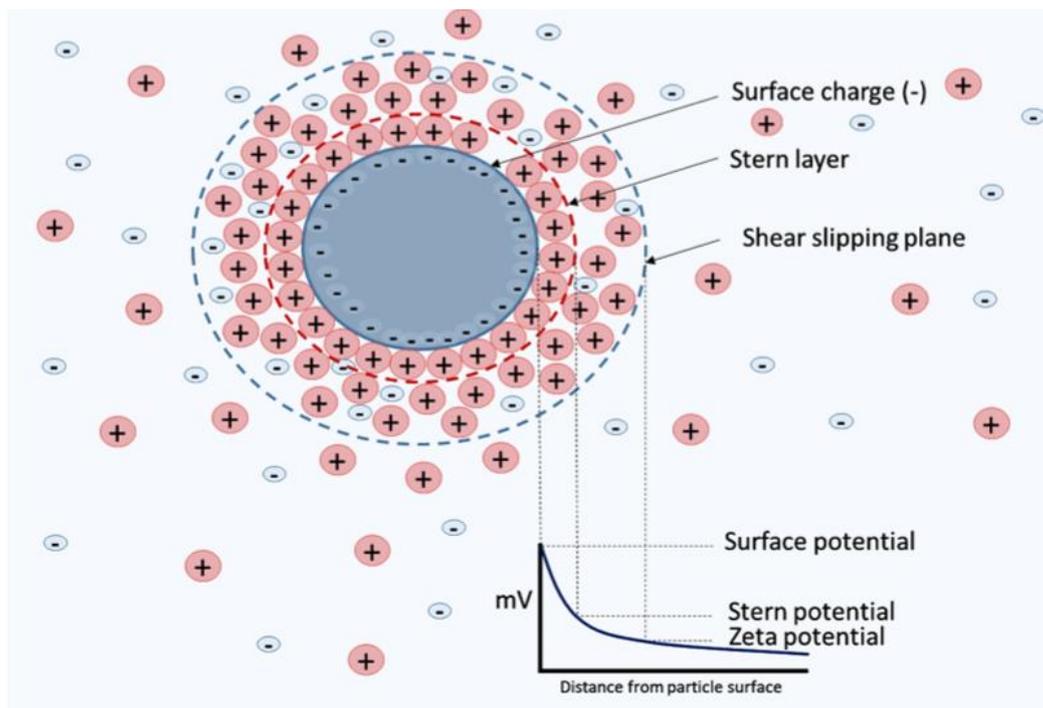


Figura 26. Esquema de la doble capa eléctrica de una partícula en suspensión con carga negativa para la determinación del potencial zeta (215).

3.2.1.3.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es una herramienta fundamental en el estudio ultraestructural de materiales, como las nanopartículas PEG-cSLNs. Con la

capacidad de ampliar la imagen de una muestra en hasta un millón de veces, el TEM utiliza un haz de electrones acelerados a gran velocidad para iluminarla. Este haz atraviesa la muestra preparada en una lámina ultrafina, generalmente montada en rejillas de carbono inactivo para evitar reacciones no deseadas. El sistema de lentes magnéticas del TEM dirige y enfoca este haz de electrones, que luego impacta en una pantalla fluorescente o placa fotográfica para registrar la imagen aumentada en dos dimensiones, revelando tanto la superficie como la estructura interna de la muestra (Figura 27). Además, el TEM permite el análisis directo de la morfología y la composición de los materiales gracias a técnicas espectroscópicas asociadas, lo que proporciona una comprensión detallada de las propiedades de las PEG-cSLNs. Las imágenes de alta resolución obtenidas pueden visualizarse en tiempo real en una pantalla fluorescente, o bien, pueden registrarse digitalmente o en negativos para análisis posteriores (169,170).

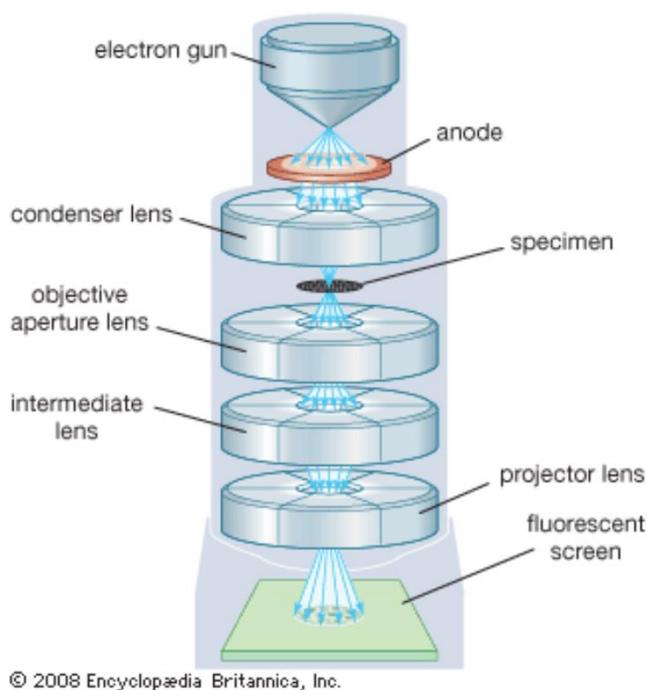


Figura 27. Esquema de la estructura interna de un microscopio electrónico de transmisión (216).

En este contexto, se llevó a cabo el análisis del contenido y la homogeneidad de la superficie de todas las formulaciones de nanopartículas (PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar y reconstituidas liofilizadas) utilizando un TEM Tecnai Spirit equipado con un cátodo LaB6. Las imágenes se grabaron a 120 kV utilizando una cámara CCD Megaview de 1376 x 1024 píxeles. Las muestras se adsorbieron en rejillas de cobre recubiertas de carbón y se tiñeron negativamente con una solución de metilcelulosa al 4%.

3.2.1.4 Análisis de Factores en las PEG-cSLNs

Una vez obtenidos los valores de las características fisicoquímicas de las PEG-cSLNs, se procedió a analizar el impacto de tres factores: la modificación del protocolo de formulación de las cSLNs, la PEGilación en las CO-SLNs y, por último, la liofilización de las PEG-cSLNs. Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics, versión 22 (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.) y GraphPad Prism versión 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

3.2.1.4.1 Comparación de Protocolos para Reducir el Tamaño de Partícula

En el primer análisis, se compararon las tres variables (PSD, Pdl, y ZP) de cada formulación entre el protocolo original y el modificado, una vez establecido para la manufactura de las PEG-cSLNs, con el fin de reducir el tamaño de partícula. Este análisis se realizó utilizando la prueba paramétrica pareada de *t-Student* cuando los datos seguían una distribución normal. En caso contrario, se empleó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para determinar si existen diferencias significativas al aplicar cambios en el protocolo original.

3.2.1.4.2 Efecto de la PEGilación en las cSLNs

El segundo análisis tuvo como objetivo determinar el efecto de la PEGilación sobre las tres variables (PSD, Pdl, y ZP), comparando las SLNs con PEG y sin PEG (CO-cSLNs). Se utilizó la prueba paramétrica no pareada de *t-Student*, dado que los datos de todas las muestras se encontraban distribuidos normalmente.

3.2.1.4.3 Efecto de la Liofilización en las PEG-cSLNs

El tercer análisis consistió en determinar el impacto del proceso de liofilización en las nanopartículas. Se compararon las tres variables (PSD, Pdl, y ZP) entre las PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar y las liofilizadas. Se emplearon la prueba pareada de *t-Student* y la prueba de Wilcoxon en caso de que la distribución no fuera normal.

3.2.1.5 Estudio y Optimización del Proceso de Liofilización

3.2.1.5.1 Modificación de los Parámetros del Proceso de Liofilización

Se procedió a estudiar el proceso de liofilización utilizando dos PEGilados diferentes (Myrj 52 y Tefose 1500), seguido de la caracterización fisicoquímica de las PEG-cSLNs liofilizadas para evaluar y determinar el impacto de la liofilización en ellas. Dado los efectos adversos del proceso de liofilización en las PEG-cSLNs, se optó por buscar

compuestos PEGilados con un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) más adecuado para una emulsión O/W (8–10) (171) en lugar del PEG Gelucire 50/13, cuyo HLB es más hidrosoluble. El HLB representa la eficiencia relativa de la porción hidrófila de un tensoactivo con la porción lipófila de la misma molécula. Por tanto, valores entre 8 y 10 indican una dispersión lechosa estable en agua, similar a una emulsión. En este contexto, se incluyeron dos nuevos PEGs: Tefose 1500 (10) y 63 (9.5).

Se realizaron dos fases de estudio que implicaron la manipulación de variables como temperatura (°C), vacío (mbar) y duración del proceso de liofilización (horas). La primera fase consistió en tres experimentos diferentes que modificaron la temperatura y la duración del proceso durante el secado primario (rampas), con un previo congelamiento rápido y constante. Este estudio comparó las condiciones de un ciclo convencional de liofilización (Sección 3.2.1.2.2) con diferentes ensayos en los que se modificaron los parámetros o se agregaron nuevos pasos al procedimiento, lo que generó rampas de temperatura. Las condiciones específicas de estas rampas de temperatura se encuentran detalladas en el Anexo IV.

Una vez establecidas las condiciones base de temperatura y duración del proceso para la liofilización, se llevó a cabo una segunda fase del estudio. En este sentido, se exploraron diferentes valores de vacío (0.1–0.4 mbar) durante el secado primario con el objetivo de determinar la mejor condición para mantener las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas. Se realizaron ocho liofilizaciones utilizando las condiciones base establecidas, pero con variaciones en el vacío, que se detallan en el Anexo IV. Con los resultados obtenidos, se realizaron cuatro liofilizaciones adicionales usando los valores previamente establecidos de temperatura, duración del proceso y vacío, los cuales también se especifican en el Anexo IV.

3.2.1.5.2 Efecto del Proceso de la Liofilización en las PEG-cSLNs

Este análisis tuvo como objetivo determinar el impacto del estudio del proceso de liofilización en las nanopartículas. Se compararon las tres variables (PSD, Pdl, y ZP) entre las PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar y las liofilizadas, tanto filtradas (43–48 µm) como sin filtrar. Además, se compararon las PEG-cSLNs liofilizadas sin filtrar con las filtradas de cada formulación. Para llevar a cabo estas comparaciones, se utilizaron la prueba pareada de *t-Student* y la prueba de Wilcoxon en casos donde los datos no siguen una distribución normal.

3.2.1.5.3 Crioprotectores

Los crioprotectores desempeñan un papel fundamental en la preservación de las nanopartículas, tal y como se describe en la sección 1.7.4. Una vez establecidos los parámetros estudiados del proceso de liofilización (temperatura, vacío y duración), se procedió a evaluar tres crioprotectores diferentes: sacarosa, trehalosa y sucralosa, junto con tres tipos de PEGs distintos (Myrj S100 y los Tefoses 63 y 1500). Se optó por reemplazar el Myrj 52 por el S100 debido a los resultados obtenidos en el apartado anterior, y se evaluó la formulación tanto con el Tefose 63 como con el 1500, dado que los resultados fueron positivos. El objetivo de este análisis fue determinar el crioprotector más efectivo para mantener la integridad de las PEG-cSLNs. Posteriormente, se examinaron diversas concentraciones (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%) del crioprotector seleccionado para identificar la más efectiva en contrarrestar los efectos adversos de la liofilización en las nanopartículas.

3.2.1.5.4 Efecto de los Crioprotectores en las PEG-cSLNs

La inclusión de crioprotectores implicó analizar el impacto de los diferentes crioprotectores utilizados y sus concentraciones en las características de las nanopartículas. Se compararon las tres variables (PSD, Pdl, y ZP) entre las PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar y liofilizadas con diversas combinaciones de crioprotectores y concentraciones. Se emplearon pruebas estadísticas como la prueba pareada de *t-Student* y la prueba de Wilcoxon para el análisis, considerando la distribución de los datos.

3.2.1.5.5 Optimización del Proceso de Liofilización

Por último, tras el estudio de los parámetros del proceso de liofilización y la identificación del crioprotector óptimo con su concentración ideal para proteger las nanopartículas durante la liofilización, se procedió a optimizar el proceso. Este procedimiento implicó el diseño de seis rampas de temperatura, con ajustes en la temperatura y duración del proceso, tanto en el secado primario como en el secundario. En este caso se empleó el PEG Tefose 63 debido a los resultados positivos obtenidos en los apartados previos. Las condiciones específicas establecidas para esta optimización se detallan en el Anexo IV.

3.2.1.5.6 Efecto de la Liofilización Optimizada en las PEG-cSLNs

El objetivo de este análisis fue evaluar el impacto del proceso de liofilización optimizado en las nanopartículas. Se compararon las tres variables (PSD, Pdl, y ZP) entre las PEG-

cSLNs en suspensión sin liofilizar y después de la liofilización, tanto en muestras filtradas (43–48 μm) como sin filtrar. Además, se realizaron comparaciones entre las PEG-cSLNs liofilizadas sin filtrar y las filtradas de cada formulación. Se emplearon pruebas estadísticas como la prueba pareada de *t-Student* y, en caso de que los datos no presentaran una distribución normal, se utilizó la prueba de Wilcoxon.

3.2.1.6 Reducción de Tamaño de Partícula de las PEG-cSLNs

3.2.1.6.1 Incorporación de la Cistamina en las PEG-cSLNs

Una vez determinada la cantidad óptima de PEG, se llevó a cabo un estudio factorial para establecer la proporción precisa de cistamina a incorporar en la matriz de las PEG-cSLNs con el objetivo de reducir el tamaño de partícula. La formulación de las nanopartículas se realizó mediante microemulsificación caliente, siguiendo el protocolo descrito previamente (Sección 3.2.1.1).

Brevemente, se pesaron X mg de ácido esteárico (SA), Y mg de colesteril oleato (CO), Z mg de PEG y C mg de cistamina (cys), según la cantidad específica requerida, sumando un total de 500 mg (Anexo III, Tabla S2). La fase dispersa se preparó de la siguiente manera: el PEG con el CO se fundieron en un vaso de precipitados de 5 mL, mientras que en otro vaso de 50 mL se disolvió la cistamina junto con el SA en 10 mL de etanol caliente. Posteriormente, se evaporó la mayor cantidad de etanol sin que la cistamina y el SA se solidificaran. Una vez que la cistamina y el SA se disolvieron completamente, el PEG con el CO estuvieron fundidos y los excipientes de la fase acuosa se diluyeron, se vertió la fase lipídica en la solución acuosa para crear la emulsión caliente, seguida de la ultra agitación y los pasos adicionales mencionados en la sección 3.2.1.1. Posteriormente, se realizaron ensayos de solubilidad, sonicación y temperatura para estudiar la incorporación de cistamina y obtener nanopartículas con las propiedades fisicoquímicas adecuadas. Las características fisicoquímicas de las PEG-cSLNs con cistamina se determinaron mediante las técnicas detalladas en la sección 3.2.1.3.

3.2.1.6.2 Efecto de la Cistamina en las PEG-cSLNs

Después de la incorporación de la cistamina en la matriz de las PEG-cSLNs, se realizó un análisis para evaluar su impacto en las tres variables (PSD, Pdl, y ZP) en las SLNs tanto con PEG como sin PEG (CO-cSLNs). En este análisis se emplearon pruebas estadísticas como la prueba pareada de *t-Student* y la prueba de Wilcoxon en casos en que los datos no siguen una distribución normal.

3.2.1.7 Estudio de Estabilidad de las PEG-cSLNs

El estudio de estabilidad consistió en determinar los valores del tamaño de partícula, Pdl y potencial zeta utilizando un Zetasizer Nano ZS90 y Nano-Z respectivamente, tanto para las PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar como para las reconstituidas tras la liofilización. Las SLNs suspendidas sin liofilizar se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un mes, mientras que las liofilizadas se conservaron durante un año bajo esas mismas temperaturas. Los estudios de estabilidad se llevaron a cabo con las PEG-cSLNs almacenadas en viales de vidrio tipo II con tapón elastomérico y encapsulados, para simular la estabilidad real del medicamento desarrollado (suspensión parenteral extemporánea). Para ello, se prepararon los viales necesarios y en cada período de estudio se analizó un vial distinto. En el caso de las PEG-cSLNs liofilizadas, se reconstituyeron con 4 mL de agua MiliQ. Las mediciones de las características fisicoquímicas de las PEG-cSLNs se registraron cada 4–6 días durante el estudio mensual de estabilidad, y en el estudio anual se realizaron mediciones al final del primer mes y luego cada tres meses hasta completar el año. Para el análisis de correlación y regresión, se utilizaron las pruebas de Pearson o Spearman según si el análisis es paramétrico o no. Además, se realizaron estudios de estabilidad durante un mes, a las dos temperaturas mencionadas anteriormente, de las PEG-cSLNs con cistamina suspendidas en medio acuoso sin liofilizar.

3.2.2 SECCIÓN BIOLÓGICA

3.2.2.1 Estudio de Viabilidad Celular con las PEG-cSLNs

3.2.2.1.1 Mantenimiento de las Líneas Celulares y Pases

La citotoxicidad se refiere a los efectos tóxicos en célula vivas, y los ensayos de citotoxicidad son pruebas utilizadas para medir la tasa de proliferación y los efectos tóxicos en las células (172). Uno de estos ensayos, centrado en la evaluación de la viabilidad celular mediante microscopía óptica, permite observar directamente los cambios inducidos por la sustancia en estudio sobre las células tratadas. El protocolo implica sembrar las células hasta alcanzar la confluencia deseada. Si son células adherentes, se las deja adherir al fondo de la placa incubándolas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de la adición de la sustancia o formulación a estudiar y una posterior incubación. Los cambios se observan en las horas siguientes a la adición de la sustancia, y los resultados se registran mediante la captura de fotografías (173).

En este sentido, después de 48 horas de haber sembrado una placa P100 y alcanzado una confluencia celular aproximada del 80–90%, se realiza el pase celular y, si es

necesario, el plaqueo. El cultivo celular se llevó a cabo utilizando células humanas embrionarias de riñón 293T (HEK293T) obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.). Estas células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM, con bajos niveles de glucosa (1 g/L de D-Glucosa), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% v/v inactivado por calor, penicilina/estreptomicina (100U y 0.1 mg/mL, respectivamente), 4 mM de L-glutamina y una solución de aminoácidos no esenciales.

Para realizar los pases celulares y su mantenimiento, el primer paso es aspirar el medio de cultivo y limpiar las células con PBS 1X. Luego, se añadió tripsina para levantar y separar las células, utilizando tripsina diluida al 25% (0.5 mL de tripsina en 2 mL de PBS 1X) para las células HEK293T. La placa con la tripsina se dejó en el incubador durante aproximadamente 5 min, y a continuación se inactivó añadiendo medio completo. Se realizó un pase 1:6 con las células HEK293T (el volumen de medio + tripsina en HEK293T fue de 6 mL), y finalmente, se transfirieron 1 mL de células a una nueva placa P100 con 9 mL de medio. Esta placa se incubó en condiciones de 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

3.2.2.1.2 Análisis de Citotoxicidad con Microscopio Óptico

Para evaluar la citotoxicidad, las células HEK293T se cultivaron en placas M6 de 35 mm hasta alcanzar aproximadamente un 70–80 % de confluencia. Tras reconstituir y filtrar (43–48 µm) las nanopartículas liofilizadas, se añadieron diferentes volúmenes de PEG-cSLN (0–25 µL) a los cultivos celulares, los cuales se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ como se describió anteriormente (128). Después de 24 horas, se tomaron fotografías con el microscopio óptico y se reemplazó el medio de cultivo inicial por uno fresco. Posteriormente, a las 48 horas, se tomaron nuevas fotografías de las placas con las células y las nanopartículas. Es elemental subrayar que este método, aunque cualitativo, y con un componente subjetivo, proporciona una comprensión morfológica de las células tratadas en comparación con las no tratadas. Sin embargo, para complementar estos resultados cualitativos, se emplean otras técnicas cuantitativas y totalmente objetivas como la citometría de flujo. Este mismo protocolo se aplicó a las PEG-cSLNs con y sin cistamina suspendidas en medio acuoso sin liofilizar para analizar de su viabilidad celular.

3.2.2.1.3 Análisis de Citotoxicidad con Citometría de Flujo

Se llevó a cabo un análisis de viabilidad celular mediante citometría de flujo para obtener mediciones cuantitativas y multiparamétricas de la población celular. Las células

adheridas en placas se recogieron en tubos eppendorf, donde se suspendieron individualmente y se evaluaron mediante las características de dispersión de luz y fluorescencia mientras pasan a través de un haz de luz. Entre los colorantes comúnmente utilizados en ensayos de citotoxicidad, el yoduro de propidio (IP) se empleó como agente indicador fluorescente. Este agente permite distinguir entre células vivas, necróticas y/o apoptóticas al intercalarse con el ADN de células con membranas plasmáticas comprometidas, siendo impermeable a las membranas intactas (Figura 28). A una longitud de onda de 535 nm, el IP emite una señal fluorescente que se utiliza para determinar la viabilidad celular y distinguir entre células vivas y muertas mediante la medición de la integridad de la membrana plasmática (174,175).

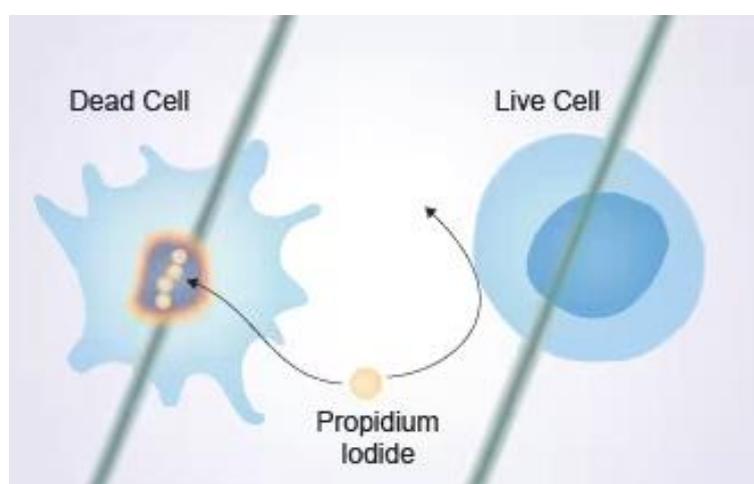


Figura 28. Esquema de la capacidad del IP para ingresar e intercalarse con el ADN de células muertas, excluyendo su efecto en las vivas (217).

En este contexto, el análisis de viabilidad/citotoxicidad se realizó mediante citometría de flujo utilizando el agente vital IP en placas M6 y condiciones de esterilidad dentro de una cabina de flujo laminar. Las células fueron cultivadas en placas P100 hasta alcanzar una confluencia aproximada del 70–80%. Una vez alcanzada esta confluencia, se plaquean 2.5×10^5 células en cada pocillo de las placas M6, previamente contando el número de células por mililitro con la cámara de Neubauer. Cada pocillo se completó con medio hasta alcanzar un volumen de 2 mL. Pasadas las 24 horas, las PEG-cSLNs resuspendidas fueron añadidas a las células, pipeteando un volumen específico de nanopartículas en cada pocillo. Se incluyeron controles negativos con agua MiliQ y controles adicionales sin fluorescencia para determinar el ruido de fondo de las células.

Después de un período de incubación (24 o 48 horas), las células se recolectaron para su tratamiento y preparación para el citómetro. Previamente a la recogida, se añadieron 40 μ L de agua oxigenada en oscuridad en cada pocillo reservado para el control positivo

y se dejaron durante 15 min en el incubador a 37 °C. Pasados los 15 min, las células fueron recolectadas y el sobrenadante de cada pocillo se transfirió a un tubo para citometría debidamente rotulado. A continuación, se añadieron 500 µL de tripsina atemperada en cada pocillo, y se dejaron durante aproximadamente 3 min para que haga efecto. Una vez tripsinizadas, las células se recolectaron y se depositaron en el tubo para citometría correspondiente, donde previamente se había colocado el sobrenadante. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min a 4 °C, eliminando el sobrenadante por decantación. El precipitado se lavó con 2 mL de PBS 1X a 4 °C y se resuspendió en la misma solución, evitando la formación de aglomerados. Se procedió a una segunda centrifugación a 3000 rpm durante 3 min a 4 °C. Por último, el precipitado se resuspendió con 300–350 µL de una solución de IP en PBS 1X de concentración 40 µg/mL, y se incubaron los tubos durante 15–20 min a 37 °C en oscuridad, estando listas las muestras para analizar en el citómetro. Se adquirieron un mínimo de 10000 eventos activando las dispersiones delanteras y laterales para excluir restos celulares y la fluorescencia emitida se analizó en el canal FL-3. Este mismo protocolo se utilizó con las PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar.

3.2.2.2 Formación de Complejos con Material Genético y Eficiencia de Carga de las PEG-cSLNs

Se empleó un ensayo de retardo en gel de agarosa para los estudios biológicos que implican ácidos nucleicos en la formación de los SLNplejos y la eficiencia de carga de las PEG-cSLNs con material genético. Este método consiste en la preparación de geles de agarosa D-1 al 1% en 1X Tris-acetato-EDTA (TAE) (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), teñidos con una solución de 0.04 µL/mL RedSafe® para la visualización de ácidos nucleicos, donde se cargaron los SLNplejos y/o el ADN desnudo. Se aplicó una corriente eléctrica de negativo a positivo (de arriba a abajo) en el gel para movilizar el ADN desnudo, que tiene carga negativa. De esta manera, se pudo observar si el ADN permanecía libre y corría a través del gel mediante movilidad electroforética, o si las PEG-cSLNs eran capaces de formar complejos con el material genético, evitando su movilidad a través del gel.

Para realizar el ensayo, se prepararon los complejos mezclando las PEG-cSLNs con la cantidad adecuada de ADN plasmídico (pDNA) correspondiente al constructo del complejo mayor de histocompatibilidad (*MHC*) con el reportero de la enzima luciferasa, denominado p3xMHC-LUC (5400 pb). Este constructo contiene elementos promotores del oncogén *FOS* y tres copias del elemento *MHC* de clase I. Los SLNplejos se prepararon combinando X µL de PEG-cSLNs (determinado anteriormente, sección

3.2.2.1) con diferentes cantidades (500 ng, 750 ng, 1000, ng, and 2000 ng) de pDNA en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Esta mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 40–45 min para permitir la formación de los complejos.

Posteriormente, se cargaron en cada pocillo 20 µL de muestra mezclada con solución de carga 6X (NEB B7025S), compuesta por 2.5% Ficoll-400, 10 mM EDTA, 3.3 mM Tris-HCl (pH 8.0–25 °C). La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 45 min. Los fragmentos se visualizaron bajo luz UV utilizando un transiluminador UV GelDoc® EZ Imager, y se fotografiaron con el software BioRad® ImageLab 5.2.1. Asimismo, se aplicó el mismo protocolo para evaluar la eficiencia de carga de las PEG-cSLNs con y sin cistamina, utilizando únicamente nanopartículas suspendidas en medio acuoso sin liofilizar.

3.2.2.3 Ensayo de Transfección con Plásmido Luciferasa mediante las PEG-cSLNs

El ensayo de luciferasa, una técnica ampliamente utilizada en biología molecular, emplea la enzima luciferasa y un sustrato (luciferina) para analizar la regulación génica a nivel de transcripción mediante una reacción enzimática que genera bioluminiscencia, permitiendo su cuantificación. La transfección de este plásmido permite la expresión de la luciferasa (*Firefly Luciferase*) de luciérnaga (*Photinus pyralis*), una proteína monomérica de 61 kDa, reconocida por su sensibilidad, reproducibilidad y compatibilidad con reporteros de control interno. Cabe mencionar que la actividad reportera del transgén introducido se manifiesta rápidamente, sin necesidad de procesamiento post-traducciona (176,177).

Este ensayo resulta útil para investigar si una proteína de interés regula la expresión de un gen específico a nivel de transcripción. Cuando dicha proteína activa la transcripción, la célula sintetiza la enzima luciferasa, generando una reacción quimioluminiscente altamente eficiente y cuantificable. Además de ser una técnica simple y rápida, se fundamenta en la oxidación de la luciferina, produciendo oxiluciferina y luz cuya cantidad emitida es directamente proporcional a la expresión del plásmido en una población celular, y puede ser cuantificada con precisión mediante un equipo adecuado. Esta reacción requiere la presencia de ATP, O₂ y Mg²⁺ como cosustratos (177,178). Cuando una proteína de interés activa la transcripción, un luminómetro detecta una señal bioluminiscente brillante y cuantifica la actividad luciferasa. Por el contrario, si la proteína reprime la transcripción, el luminómetro no registrará ninguna señal. Un ensayo que puede ser utilizado es el llamado *Dual Luciferase (Firefly-Renilla) Assay System* (Figura 29). Este sistema fue desarrollado para normalizar la señal producida por *Firefly*

Luciferase en el mismo punto de estudio. Este sistema dual permite la detección simultánea por diferentes longitudes de onda, una verde y otra roja generando luminiscencia (179).

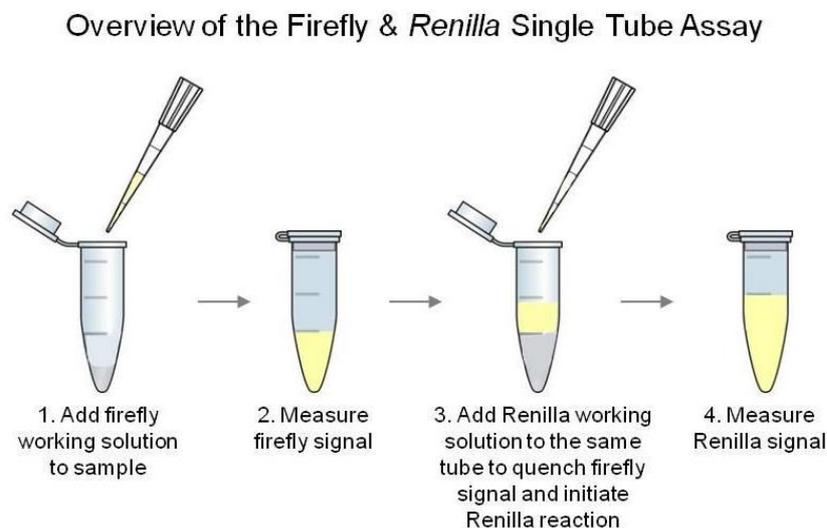


Figura 29. Resumen de cómo se preparan las muestras para la lectura en el Dual Luciferase Assay System (218).

En los experimentos de esta tesis, se utilizó este ensayo para evaluar la eficiencia de transfección, dado que la luminiscencia está directamente relacionada con la cantidad de células transfectadas por los SLNplejos. Para llevar a cabo esta evaluación, se utilizó la construcción plasmídica p3xMHC-LUC para la formación de los SLNplejos, como se detalla en el punto 1.5 de la introducción, siendo esencial para la transfección de material genético debido a la baja efectividad de la transfección de ácidos nucleicos desnudos. Para evaluar la eficiencia de transfección utilizando las PEG-cSLNs como vectores, se sembraron células HEK293T en placas M6 con una confluencia aproximada del 70–80%, bajo las mismas condiciones mencionadas en la sección 3.2.2.1. Después de 24 horas, cuando las células alcanzaron la confluencia deseada, se reemplazó el medio de cultivo por 1.5 mL de medio sin suero ni antibióticos (-FBS -P/S) antes de proceder con la transfección.

A continuación, para formar los complejos entre las nanopartículas y el material genético, se mezclaron X μg de p3xMHC-LUC con Y μL de PEG-cSLNs resuspendidas en 4 mL de agua MiliQ autoclavada en tubos eppendorf de 1.5 mL, siguiendo el mismo procedimiento detallado en la sección 3.2.2.2. Tras dejar esta mezcla a temperatura ambiente durante 40–45 min para la formación de los SLNplejos, se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por triplicado. Una vez obtenido los complejos,

se procedió a transfectar las células, añadiendo medio de cultivo sin suero y ni antibióticos a cada tubo de SLNplejos, pipeteando el volumen deseado en cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C para asegurar una transfección adecuada. Pasadas 4–6 h desde la transfección, se completó cada pocillo con 200 µL de FBSi o se reemplazó el medio por completo con 2 mL de medio fresco.

Tras 48 h post-transfección, se procedió a la extracción de proteínas para evaluar los niveles de luciferasa. Este proceso implicó descartar el sobrenadante y añadir 1.5 mL de PBS 1X a 4 °C para resuspender las células en cada pocillo. Las células fueron recolectadas y transferidas a tubos eppendorfs debidamente etiquetados, manteniéndolos a 4 °C para prevenir la desnaturalización de las proteínas. Las muestras fueron centrifugadas para recolectar las células, y el pellet resultante se lisó mediante la adición de 80–100 µL de tampón de Lisis (compuesto por 1 mL de tampón T7, 10 µL de PMSF y 1 µL de DTT) a 4 °C durante 30 min. Posteriormente, las células tratadas fueron centrifugadas a 16000 x g durante 5 min a 4 °C, y el sobrenadante (proteínas) se recogió para medir los niveles de luciferasa utilizando el FB12 Luminometer y el protocolo de ensayo de indicador de luciferasa dual, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la lectura, se mezclaron 20 µL de muestra proteica con 90 µL de reactivo LAR-II mediante pipeteo y se anota la medida de la luminiscencia. En el caso de experimentos con el sistema *Dual Luciferase*, se añadieron 90 µL del reactivo *Stop and Glow* (SG) después de la lectura inicial, se mezcló tres veces mediante pipeteo y se anota la medida de la luminiscencia. Por último, se evaluó la eficiencia de transfección de las PEG-cSLNs con cistamina utilizando el mismo protocolo mencionado anteriormente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SECCIÓN GALÉNICA

4.1.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS FORMULACIONES

4.1.1.1 Estudio Factorial

El propósito del estudio factorial fue determinar la cantidad óptima de PEG a incorporar en la matriz lipídica, evaluando el efecto de añadir entre 50–350 mg de cuatro tipos de PEG (Brij S100, Gelucire, Myrj 52 y Myrj S100) en los atributos de PSD, Pdl y ZP. Las cantidades cuantitativas de cada formulación se presentan en el Anexo III, Tabla S1. Los resultados revelaron variaciones notables en algunas de las características fisicoquímicas.

Respecto al tamaño de partícula (PSD), en casi todos los componentes PEG estudiados, no se observó una correlación clara entre la cantidad creciente de PEG y el PSD. Por ejemplo, en las formulaciones con Gelucire y Myrj 52 se observaron nanopartículas de menor tamaño al incorporar 150 mg de PEG, alrededor de 225 nm (Tabla 6). No obstante, cabe resaltar que en el caso de la formulación con Brij S100, a mayor cantidad del PEG el tamaño de las nanopartículas disminuye, obteniendo el tamaño de partícula más pequeño con la mayor cantidad de PEG (166.2 ± 23.1 nm; 350 mg). Por otro lado, la formulación con Myrj S100 alcanzó el tamaño de partícula más pequeño (222.8 ± 10.1 nm) con 250 mg de PEG, mientras que con 150 mg no se apreciaron cambios notables (227.6 ± 7.7 nm).

Respecto al Pdl, tampoco se observó una correlación clara entre la cantidad de PEG añadida y la dispersión de tamaño de partícula, siendo la mayoría de los resultados inferiores a 0.2, indicando una dispersión aceptable. Por último, en cuanto al ZP, las formulaciones con Gelucire y Myrj 52 presentaron una carga positiva mayor que las formulaciones con Brij S100 y Myrj S100. Todos los valores estuvieron dentro del rango aceptado para formar los SLNplejos (20–45 mV), por lo que estas diferencias no se consideran que puedan afectar su capacidad para producir un efecto biológico.

Tabla 6. Comparación de las características fisicoquímicas de cuatro PEGs diferentes incorporados en el núcleo de la matriz de cSLNs con cantidades variables.

PEG ^a	Cantidad (mg)	PSD (nm)	Pdl	ZP (mV)
Brij S100	50	348.8	0.252	23.4
	150	243.3	0.118	23.7
	250	216.6	0.156	20.8
	350	166.2^b	0.177	23.0
Gelucire	50	344.2	0.241	37.0
	150	222.8	0.176	34.5
	250	226.7	0.159	38.9
	350	264.6	0.185	33.1
Myrj 52	50	326.4	0.203	31.9
	150	223.7	0.129	32.3
	250	270.5	0.168	30.3
	350	246.8	0.153	28.9
Myrj S100	50	253.5	0.058	26.5
	150	227.6	0.114	29.8
	250	222.8	0.051	28.0
	350	296.6	0.086	29.5

^a Polietilenglicol (PEG), distribución del tamaño de partícula (PSD), índice de polidispersidad (Pdl) y potencial zeta (ZP).

^b En negrita: el tamaño de partícula más pequeño de cada cantidad de PEG evaluada.

La incorporación de polímeros, como PEG, en la superficie de las nanopartículas pueden potenciar la estabilidad coloidal y prolongar el tiempo de circulación a través de la estabilización estérica (139,145). Estos efectos están influenciados por el peso molecular y las características de la estructura del PEG, y se encuentran directamente correlacionados con la longitud y la densidad superficial de los PEGilados empleados (139). Notablemente, cadenas de carbono que conforman PEGs más largos podrían aumentar la estabilidad coloidal de las SLNs evitando la aglomeración de las partículas y subsecuentemente resultando en una reducción del tamaño de partícula (136).

En este sentido, el número de repeticiones de etilenglicol en cada PEG, las cuales variaron en las diferentes formulaciones desarrolladas, pueden sustancialmente afectar las características fisicoquímicas de las nanopartículas. Las formulaciones que contienen Gelucire y Myrj 52 tienen repeticiones de etilenglicol (~30–40 veces) menores en comparación con aquellas que llevan Brij S100 y Myrj S100, puesto que tienen repeticiones de hasta 100 veces. En el caso de Brij S100, mientras más cantidad de PEG se utilizó, los tamaños de partícula tendieron a disminuir. Probablemente se deba a una cobertura más extensa en la superficie de la nanopartícula generado por el PEG, resultando en un mayor pronunciamiento del efecto estérico entre las nanopartículas.

Sin embargo, es imperativo tener precaución al momento de establecer la adecuada cantidad de PEG que se va a incorporar en la superficie de las nanopartículas. Cantidades excesivas de PEG pueden comprometer la eficiencia de transfección celular y reducir el tiempo de circulación debido a la disminución de la movilidad y flexibilidad que genera el PEG (127,139). Por tanto, se eligió 150 mg de PEG para integrar la formulación final, quedando así la conformación de la fase lipídica con 140 mg de ácido esteárico y 210 mg de colesteril oleato. Los resultados proyectan que esta cantidad es la óptima para garantizar una PEGilación efectiva de las nanopartículas con adecuadas características fisicoquímicas. Las nanopartículas obtenidas de las cuatro formulaciones desarrolladas reflejaron propiedades fisicoquímicas satisfactorias, resultando en poblaciones monodispersas ($Pdl < 0.2$) con una carga catiónica superficial (ZP entre 20–45 mV) adecuada para la formación de los SLNplejos (66). En la sección 4.1.1.2 se abordará con mayor detalle el efecto que tuvo la PEGilación en las características fisicoquímicas de las nanopartículas.

4.1.1.2 Optimización de las Propiedades Fisicoquímicas en la Fabricación de las PEG-cSLNs

Tras elegir la formulación con 150 mg para continuar con los estudios posteriores, se planteó al grupo de investigación la modificación del protocolo de fabricación de las SLNs con el fin de reducir los valores de PSD y Pdl. Efectivamente, el tamaño de partícula obtenido no cumplió con las expectativas iniciales según el protocolo original, ya que se obtuvieron valores alrededor de los 250 nm (Tabla 7). Por lo tanto, se procedió a investigar métodos para reducir el tamaño de partícula con el objetivo de obtener valores de tamaño de partícula alrededor de los 150–200 nm. Durante esta investigación, se encontraron evidencias que sugieren que la reducción del tamaño puede lograrse empleando métodos tanto físicos como químicos, siendo este último, el uso de cistamina, detallada con mayor profundidad en la sección 4.1.5.

Los métodos físicos empleados para reducir el tamaño de partícula implican aumentar tanto la velocidad (rpm) como el tiempo (min) de agitación durante el proceso de fabricación mediante el UltraTurrax. Esta reducción en el tamaño puede atribuirse a varios factores, como la reducción del tiempo de estancia de los excipientes en el sistema y la aplicación de fuerzas de corte que dispersan y fragmentan partículas grandes en partículas más pequeñas. Esto promueve la nucleación homogénea y mejora la mezcla, lo que conduce a una dispersión uniforme de los ingredientes activos y permite la formación homogénea de las nanopartículas en la solución (82,180,181).

En consecuencia, se aumentó el tiempo y la velocidad de agitación de 10 a 15 min y de 20000 a 24000 rpm respectivamente. De esta manera, se logró obtener una reducción en el tamaño de partícula que oscila entre 30 a 50 nm comparado con los valores del tamaño original, siendo las formulaciones con Gelucire y DSPE las que tuvieron los tamaños de partícula más pequeños (~170 nm), seguido por las dos formulaciones con Myrj (52 y S100) con tamaños de partícula de ~180 nm y por último Brij S100 con un tamaño de partícula de 190 nm. Incluso las CO-cSLNs exhibieron una reducción en el tamaño de partícula de 237.4 ± 4.9 a 202.1 ± 10.7 nm (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de las características fisicoquímicas de cuatro PEG diferentes incorporados al núcleo de la matriz de las SLNs con dos protocolos distintos.

PEG (150 mg) ^a	Protocolo Original			Protocolo Modificado		
	PSD (nm) ^b	Pdl	ZP (mV)	PSD (nm)	Pdl	ZP (mV)
Brij S100	243.3	0.118	23.7	190.9	0.096	25.1
DSPE	—	—	—	171.5	0.131	27.5
Gelucire	222.8	0.176	34.5	171.2	0.155	27.4
Myrj 52	223.7	0.129	32.3	183.1	0.187	31.4
Myrj S100	227.6	0.114	29.8	180.1	0.138	27.4
CO	237.4	0.163	34.8	202.1	0.169	37.4

^a DSPE-mPEG2000 es el excipiente de PEG más costoso (1 g = \$500) utilizado en este estudio. Sólo se utilizó en los ensayos finales. CO representa 300 mg de colesterol oleato correspondiente a la formulación sin PEG.

^b Distribución del tamaño de partícula (PSD), índice de polidispersidad (Pdl) y potencial zeta (ZP) de todas las formulaciones fabricadas.

Adicionalmente, en todas las formulaciones, los valores del Pdl fueron menores que 0.2 (Tabla 7, protocolo modificado), indicando una sola población de PEG-cSLNs (población monodispersa) sin presencia de agregados. Con respecto al potencial zeta, todas las PEG-cSLNs presentaron áreas superficiales positivas, siendo la fórmula con Myrj 52 la que mostró el potencial más alto (31.4 ± 4.4 mV) y Brij S100 el más bajo (25.1 ± 2.4 mV) (Tabla 7, protocolo modificado).

Tras determinar las características fisicoquímicas de las PEG-cSLN utilizando el protocolo modificado, se llevó a cabo un análisis estadístico basado en los valores de los tres parámetros analizados (PSD, Pdl y ZP) de las PEG-cSLNs. El objetivo fue evaluar el impacto de la adición de PEG en las propiedades fisicoquímicas de las CO-cSLNs y determinar si esta incorporación generaba un efecto significativo. Los resultados del análisis revelaron que la PEGilación de las CO-cSLNs tuvo un efecto notable en sus propiedades fisicoquímicas. Se observó una reducción significativa en el tamaño de partícula en todas las PEG-cSLNs, excepto en la formulación con Brij S100 (Figura 30A). Además, no se encontraron diferencias significativas en la dispersión (Pdl)

de las nanopartículas, excepto nuevamente en la formulación con Brij S100 (Figura 30B). Por último, como consecuencia de la PEGilación, se evidenció una disminución significativa en la carga superficial en las cinco formulaciones desarrolladas (Figura 30C).

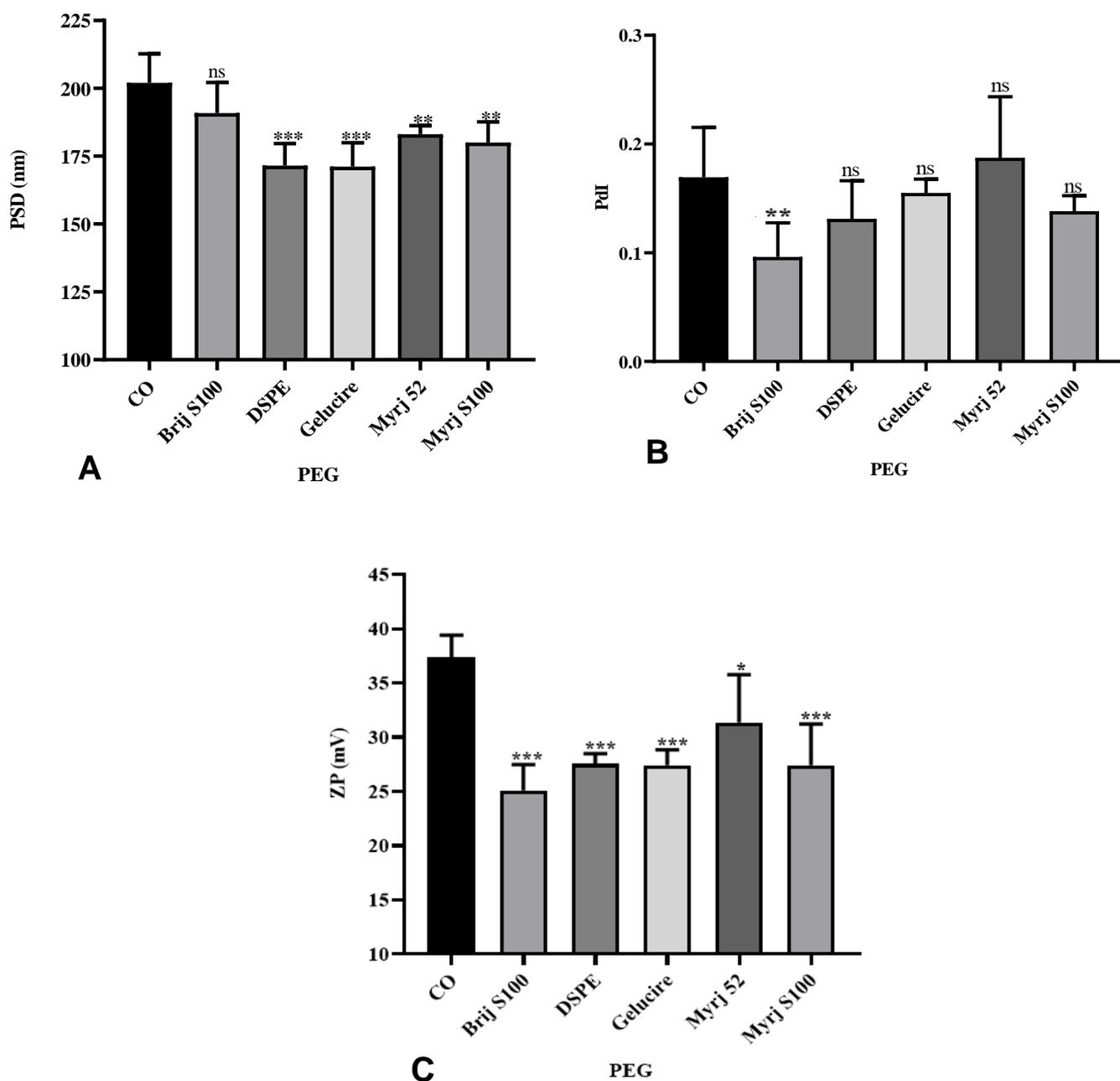


Figura 30. Análisis comparativo de la (A) distribución del tamaño de partícula (PSD), del (B) índice de polidispersidad (PDI) y del (C) potencial zeta (ZP) entre nanopartículas PEGiladas y sin PEGilar. CO representa a colesteril oleato correspondiente a la formulación sin PEG. El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

La incorporación de un nuevo excipiente en una formulación ya establecida para desarrollar CO-cSLNs afectó drásticamente las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas. La adición de PEG en la formulación original alteró el tamaño de partícula a causa del efecto de la barrera estérica que ejerce el polímero. Este efecto evita que exista aglomeración entre las nanopartículas, provocando que las PEG-cSLNs sean más pequeñas (~175 nm) que las CO-cSLN previamente desarrolladas en el grupo (~200 nm). La incorporación de PEG en la superficie de la nanopartícula, también afecta la carga superficial de ésta, posiblemente debido a que existe una reducción del área superficial, generando una reducción de la carga (136).

Es importante añadir un polímero anfifílico (PEG) conformado con largas cadenas de carbono que blindan la superficie de las CO-cSLNs convirtiéndolas en hidrofílicas, mejorando de este modo, el tiempo de circulación sanguínea. Esta característica permite aumentar la probabilidad de que cualquier medicamento alcance el sitio específico de acción antes de que sea reconocido como agente extraño y sea eliminado del cuerpo (139,140). En este contexto, los análisis estadísticos indicaron que las PEG-cSLNs desarrolladas con el protocolo modificado, incluyendo las CO-cSLNs, presentaron una reducción significativa en el tamaño de partícula (Figura 31A).

Adicionalmente, el Pdl se mantuvo estable en todas las formulaciones elaboradas con ambos protocolos desarrollados (Figura 31B). Por último, solamente las formulaciones con Gelucire y CO presentaron diferencias significativas en la carga superficial, mientras que los otros PEGs no presentaron diferencias (Figura 31C). Tanto en el protocolo original como en el modificado, las nanopartículas PEGiladas mantuvieron el rango óptimo de carga (20–45 mV) para poder formar los complejos con el material genético.

4.1.2 LIOFILIZACIÓN DE LAS PEG-cSLNs

4.1.2.1 Temperatura de Transición Vítreo (T_g)

Las cinco formulaciones desarrolladas con 150 mg de PEG fueron liofilizadas para facilitar el transporte y mantener las características fisicoquímicas a largo plazo, mejorando la estabilidad de almacenamiento y su vida útil. Antes de la liofilización, se determinó la temperatura de transición vítrea (T_g) de cuatro formulaciones (Brij S100, Gelucire, Myrj 52 y Myrj S100) para establecer los parámetros correctos y tener un adecuado proceso de liofilización. Para un óptimo proceso, la T_g debe estar por debajo de la temperatura de colapso (T_c) de las PEG-cSLNs, siendo la T_c la temperatura máxima a la cual el producto puede alcanzar la sublimación.

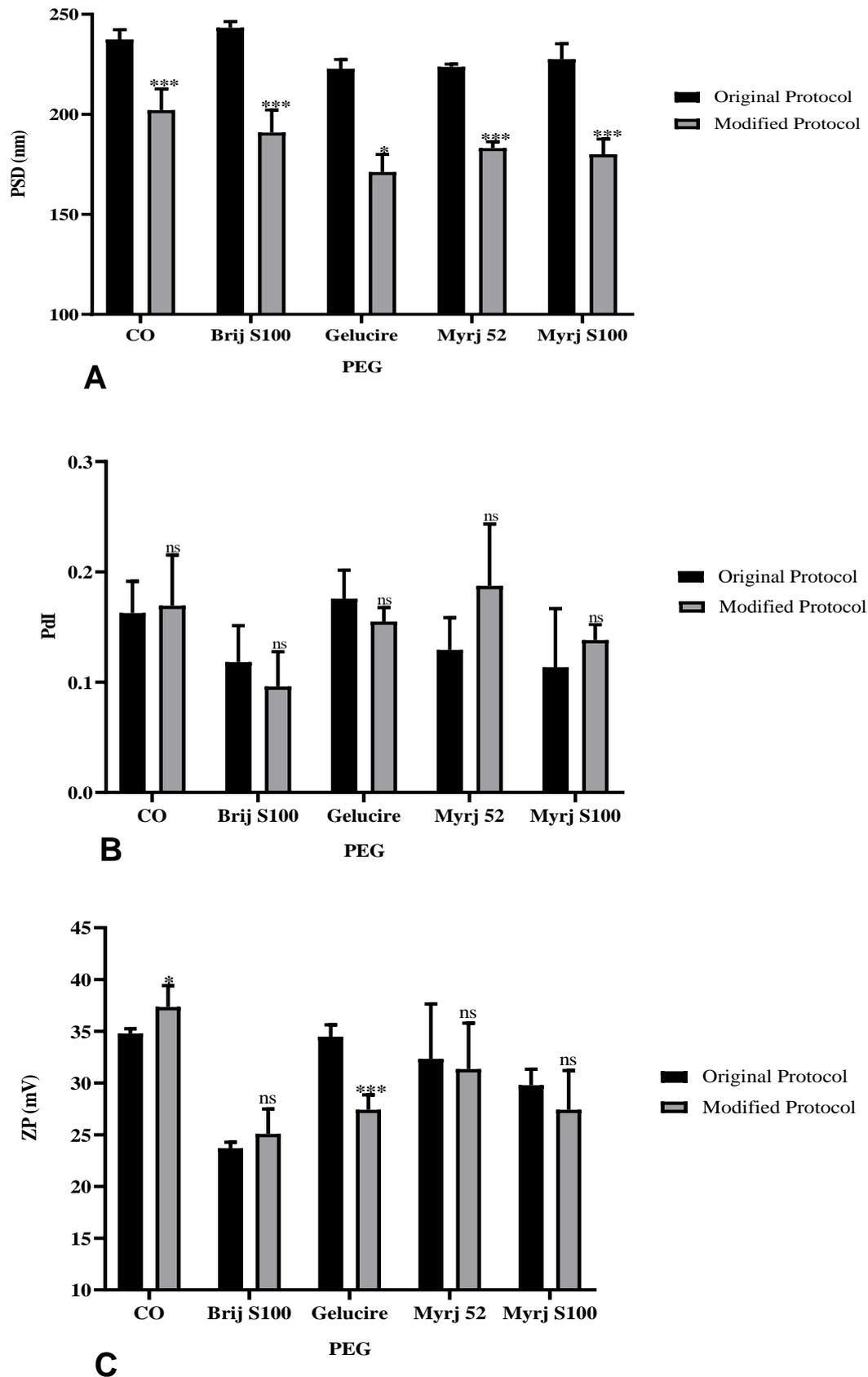


Figura 31. Análisis comparativo de la (A) distribución del tamaño de partícula (PSD), del (B) índice de polidispersidad (Pdl) y del (C) potencial zeta (ZP) de nanopartículas PEGiladas y sin PEGilar, con dos protocolos diferentes. CO representa colesterol oleato correspondiente a la formulación sin PEG. El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

La liofilización requiere de temperaturas y presiones extremadamente bajas para eliminar, a través del proceso de sublimación, el solvente, que en este caso es agua, en el cual las PEG-cSLNs se encuentran suspendidas (151). La temperatura de colapso más baja obtenida entre las diferentes formulaciones fue de -38 °C (Tabla 8; Anexo V, Figura S2). Por tanto, para que el producto se liofilice por completo, se trabajó a una temperatura 10–20 grados por debajo de la temperatura mencionada anteriormente (156). Por consiguiente, la temperatura de congelación usada en el ciclo de liofilización fue de -55 °C para asegurar la vitrificación de la matriz con trehalosa, y una apropiada liofilización de todas las formulaciones (145).

Tabla 8. Mediciones de la temperatura de transición vítrea (T_g) de cada formulación de PEG.

PEG (150 mg)	T_g (°C)
Brij S100	-35.57
Gelucire	-21.15
Myrj 52	-25.62
Myrj S100	-38.18

4.1.2.2 Liofilización

Los análisis fisicoquímicos de las PEG-cSLNs liofilizadas mostraron una población monodispersa ($Pdl \leq 0.2$) con un tamaño de partícula entre 200–300 nm y valores de potencial zeta entre 30–35 mV (Tabla 9). Entre todas las formulaciones, Gelucire exhibió el tamaño de partícula más pequeño (211.1 ± 22.4 nm). Curiosamente, las formulaciones con DSPE y Myrj S100 tuvieron tamaños de partícula (~235 nm) comparables a las nanopartículas sin PEG (CO-cSLNs). Por otro lado, la formulación con Myrj 52 tuvo un mayor tamaño de partícula (280 ± 22.7 nm), mientras que Brij S100 fue el PEGilado con el mayor tamaño de partícula obtenido (315.1 ± 15.1 nm), siendo la formulación más afectada por la liofilización (Tabla 9).

Asimismo, los análisis estadísticos revelaron un incremento significativo en el tamaño de partícula de las PEG-cSLNs liofilizadas en comparación con las PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar. Notablemente, incluso las CO-cSLNs, exhibieron un aumento considerable en el tamaño de partícula (Tabla 9; Figura 32A). Las condiciones estresantes del proceso de liofilización afectaron las características fisicoquímicas de todas las formulaciones con PEG comparado con las sin PEG. Estudios anteriores también han reportado un incremento en el tamaño de partícula después de la liofilización, proporcionando más evidencia de los efectos que ejerce la liofilización sobre las nanopartículas (145,151,156,160,182,183).

Tabla 9. Comparación de las características fisicoquímicas de nanopartículas en suspensión acuosa sin liofilizar y formulaciones liofilizadas con y sin PEG.

PEG (150 mg) ^a	PSD (nm) ^b	Pdl	ZP (mV)	PSD (nm)	Pdl	ZP (mV)
SLNs Suspendidas Sin Liofilizar			SLNs Liofilizadas			
Brij S100	190.9	0.096	25.1	315.1	0.199	28.0
DSPE	171.5	0.131	27.5	234.6	0.190	36.9
Gelucire	171.2	0.155	27.4	211.1	0.225	32.6
Myrj 52	183.1	0.187	31.4	280.0	0.256	31.6
Myrj S100	180.1	0.138	27.4	235.9	0.180	29.5
CO	202.1	0.169	37.4	235.3	0.194	44.1

^a CO representa 300 mg de colesteryl oleato correspondiente a la formulación sin PEG.

^b Distribución del tamaño de partícula (PSD), índice de polidispersidad (Pdl) y potencial zeta (ZP) de todas las formulaciones fabricadas.

Referente al Pdl, no se encontraron diferencias significativas entre las PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar y las liofilizadas correspondientes a las formulaciones con Gelucire y los dos Myrj empleados (52 y S100), reflejando la exitosa formación de nanopartículas PEGiladas monodispersas sin la presencia de aglomerados. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en las restantes dos formulaciones (Brij S100 y DSPE), incluyendo las CO-cSLNs (Figura 32B), revelando la necesidad de estudiar los parámetros críticos de proceso (CPP) de la liofilización para optimizar el proceso, y de esta manera poder reducir el estrés ejercido sobre las nanopartículas, puesto que la estabilización estérica no es garantía para mantener las características fisicoquímicas durante la liofilización (184).

Con respecto al potencial zeta, se observó un incremento en todas las formulaciones excepto en la formulación con Myrj 52, la cual mantuvo un potencial estable (Tabla 9). Este incremento puede representar una ventaja para las SLNs PEGiladas debido al inminente impacto de la PEGilación sobre la superficie de las nanopartículas, afectando la carga superficial. A pesar del aumento en el potencial zeta, no se encontraron diferencias significativas en las formulaciones con Gelucire y las dos formulaciones con Myrj (52 y S100) (Figura 32C). Por el contrario, se observaron diferencias significativas en las formulaciones restantes (Brij S100 y DSPE), como también en las CO-cSLNs, indicando la influencia del proceso de liofilización sobre el potencial, convirtiéndose en una característica relevante a la hora de formar los SLNplejos.

En conclusión, se ha observado que, aunque las características de las nanopartículas PEGiladas liofilizadas son aceptables, se debe estudiar y optimizar el proceso de liofilización. Así, en la sección 4.1.4. se expone y discute el proceso de optimización de la liofilización a través del estudio de los CPPs.

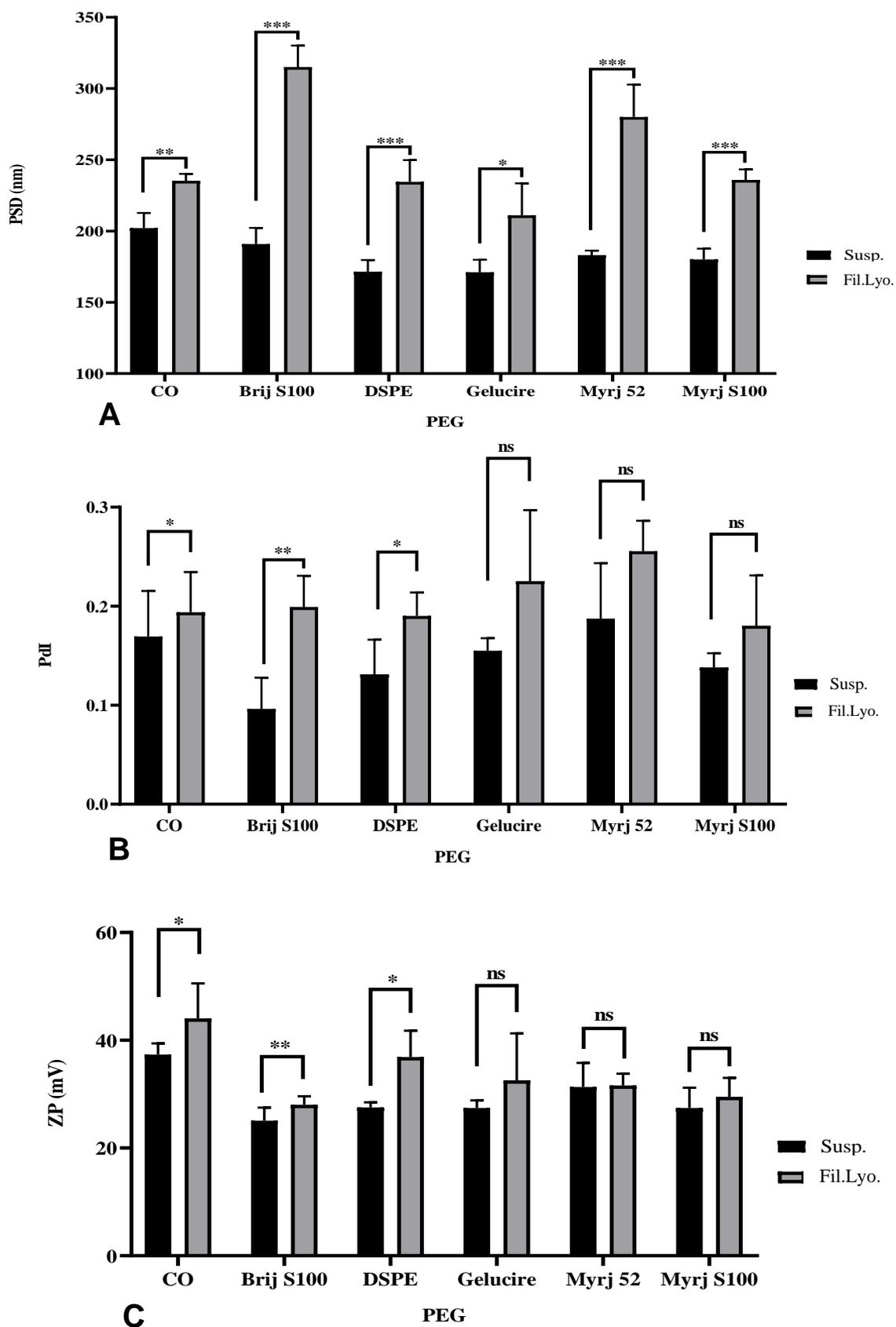


Figura 32. Análisis comparativo de la (A) distribución del tamaño de partícula (PSD), del (B) índice de polidispersidad (Pdl) y del (C) potencial zeta (ZP) de nanopartículas sin PEG y con PEG suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.) y liofilizadas filtradas (Fil.Lyo.). CO representa colesterol oleato correspondiente a la formulación sin PEG. El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

4.1.3 MORFOLOGÍA DE LAS PEG-cSLNs SUSPENDIDAS SIN LIOFILIZAR Y LIOFILIZADAS

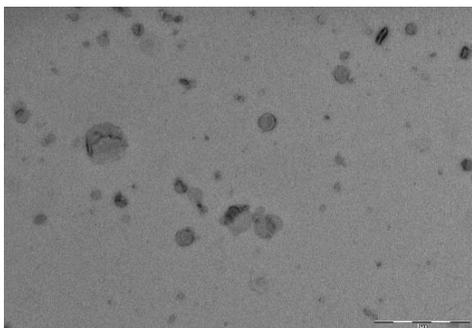
Las imágenes obtenidas por medio de microscopía por TEM confirmaron la presencia de una proporción significativa de PEG-cSLNs esféricas y bien definidas tanto antes de liofilizar como liofilizadas. Estas imágenes revelan la presencia de SLNs con una matriz sólida y la ausencia de estructuras amorfas en todas las formulaciones desarrolladas (Figura 33), corroborando que el proceso de liofilización no tuvo un impacto perceptible en la forma de las nanopartículas. Además, la morfología fue sustancialmente diferente entre las formulaciones, debido a que las características fisicoquímicas fueron influenciadas por los excipientes PEGilados específicos empleados en la matriz de las nanopartículas.

4.1.4 ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN

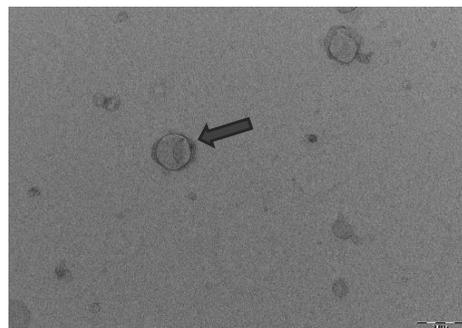
4.1.4.1 Filtración de las PEG-cSLNs Liofilizadas

Una vez que las PEG-cSLN fueron liofilizadas y caracterizadas, se procedió a reconstituirlas con 4 mL de agua MiliQ para evaluar sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, tras un tiempo de reconstitución de 2 min, se observó una incorrecta reconstitución de las PEG-cSLN, evidenciada por la formación de agregados. Como resultado, tanto el tamaño de partícula (entre 250–300 nm) como el Pdl (>0.2) aumentaron significativamente en comparación con las PEG-cSLN suspendidas en medio acuoso sin liofilizar. Para mejorar la polidispersidad y reducir el tamaño de las nanopartículas, se filtraron (43–48 μm) los sistemas coloidales reconstituídos de todas las formulaciones, obteniendo como resultado PEG-cSLN monodispersas ($\text{Pdl} \leq 0.2$) con tamaños entre 200–270 nm (Tabla 10). Este proceso demostró que, aunque el filtrado permitió obtener nanopartículas similares a las anteriores a la liofilización, se requieren más esfuerzos para evitar la pérdida de material debido a la presencia de agregados.

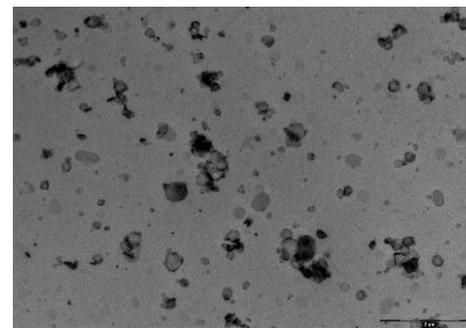
No obstante, el análisis estadístico realizado comparando las nanopartículas sin liofilizar, liofilizadas sin filtrar y liofilizadas filtradas mostró que el tamaño de partícula y el Pdl de las nanopartículas reconstituídas filtradas aumentó significativamente en comparación con las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar. Inclusive las nanopartículas sin PEG (CO-SLN) presentaron un aumento significativo en el tamaño y el Pdl (Figura 34A y Figura 34B) a causa de las condiciones estresantes ejercidas por el proceso de liofilización, afectando las características fisicoquímicas de todas las formulaciones.



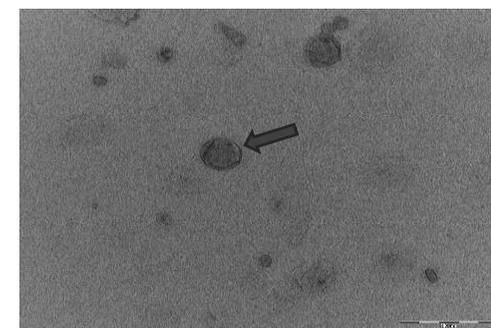
CO Susp. Scale: 1 μm



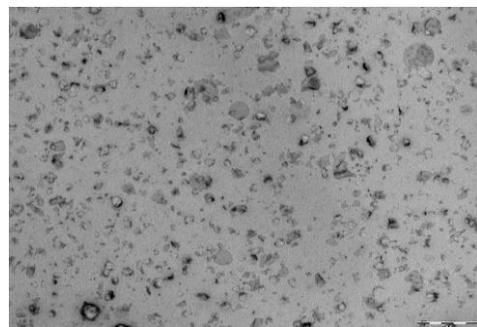
**CO Susp. Scale: 200 nm
PS ~160 nm**



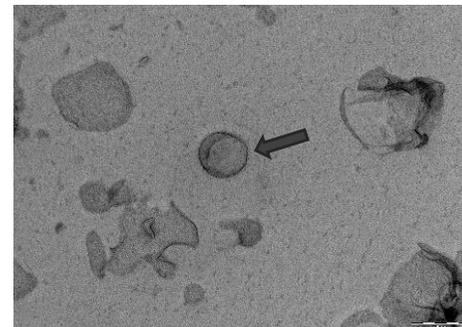
CO Lyo. Scale: 2 μm



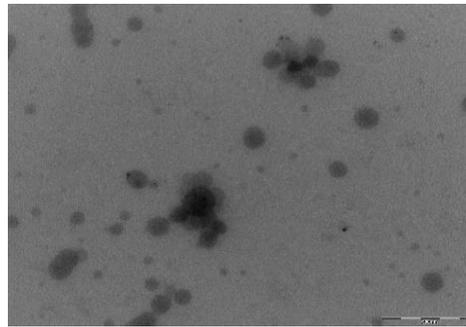
**CO Lyo. Scale: 500 nm
PS ~195 nm**



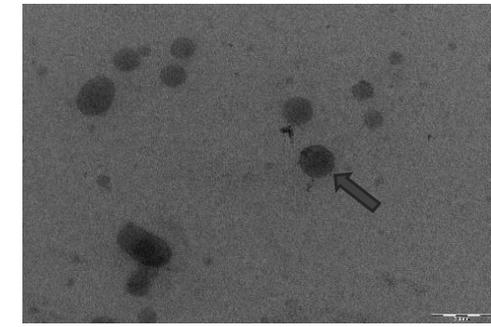
Brij S100 Susp. Scale: 2 μm



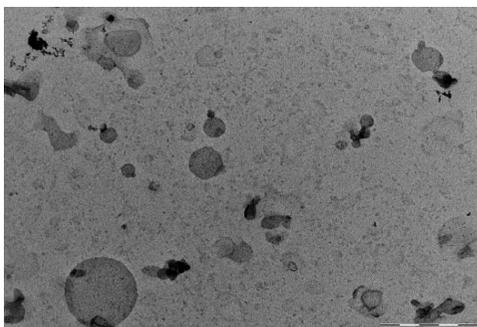
**Brij S100 Susp. Scale: 200 nm
PS ~165 nm**



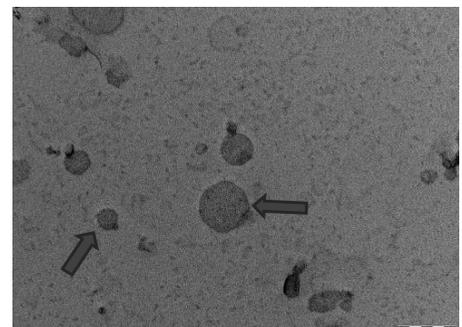
Brij S100 Lyo. Scale: 500 nm



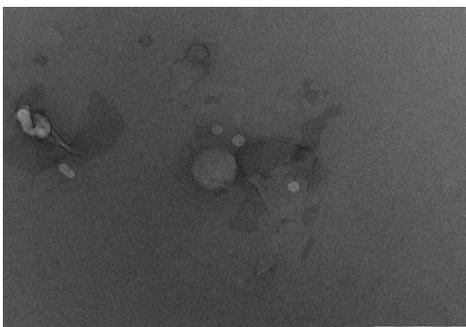
**Brij S100 Lyo. Scale: 200 nm
PS ~115 nm**



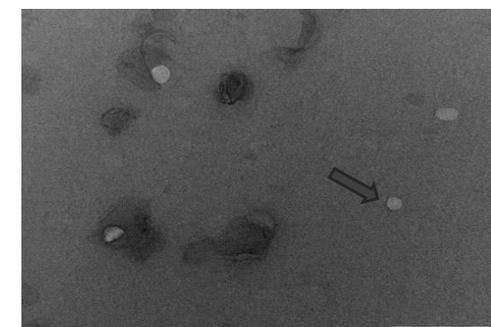
DSPE Susp. Scale: 500 nm



**DSPE Susp. Scale: 200 nm
PS ~70 nm and ~175 nm**

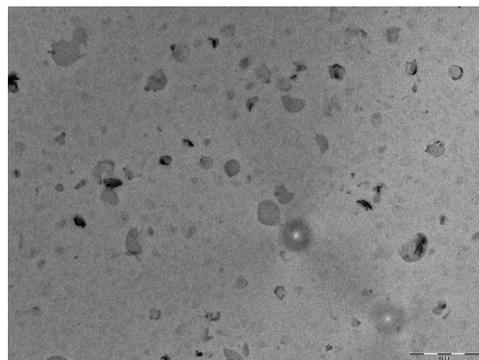


DSPE Lyo. Scale: 500 nm

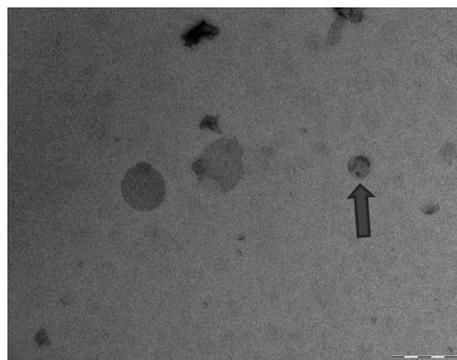


**DSPE Lyo. Scale: 500 nm
PS ~75 nm**

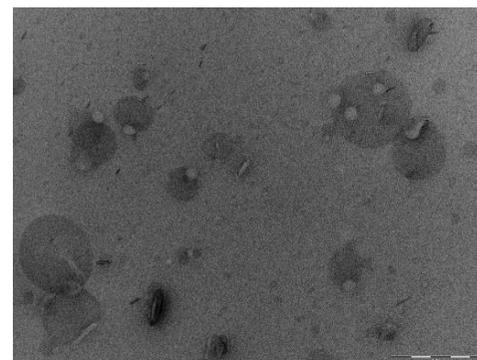
Figura 33. Continúa.



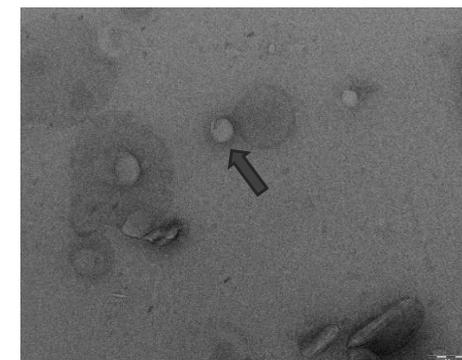
Gelucire Susp. Scale: 1 μm



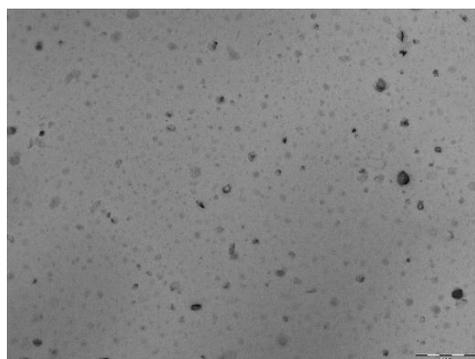
Gelucire Susp. Scale: 500 nm PS ~165 nm



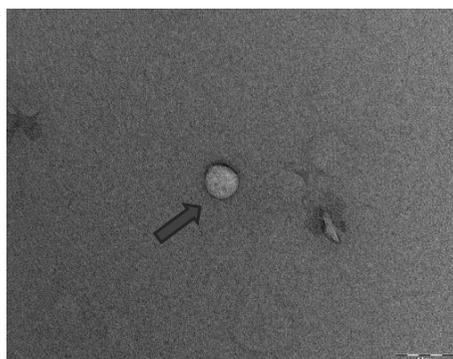
Gelucire Lyo. Scale: 500 μm



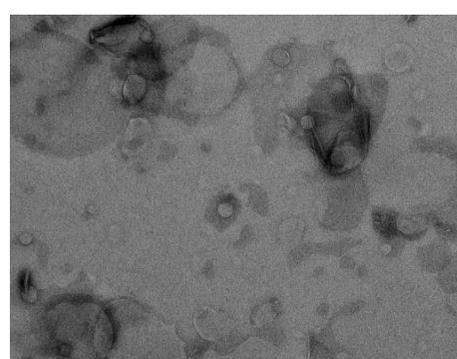
Gelucire Lyo. Scale: 200 nm PS ~105 nm



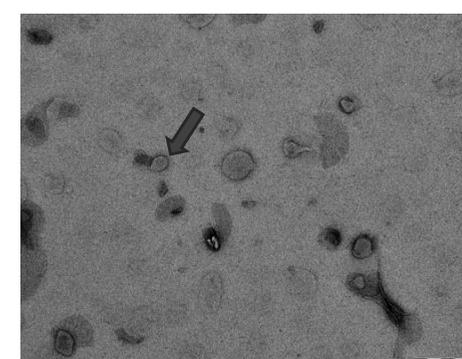
Myrj 52 Susp. Scale: 2 μm



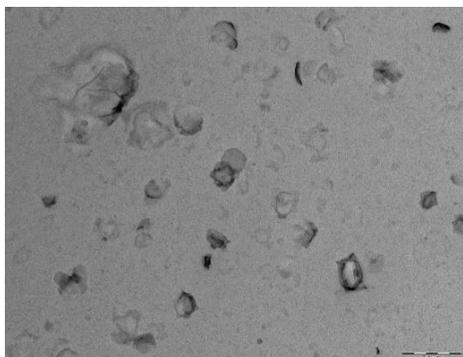
Myrj 52 Susp. Scale: 200 nm PS ~120 nm



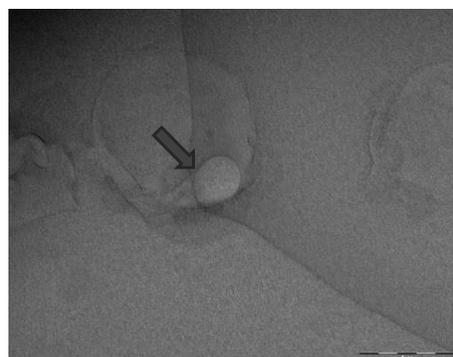
Myrj 52 Lyo. Scale: 500 nm



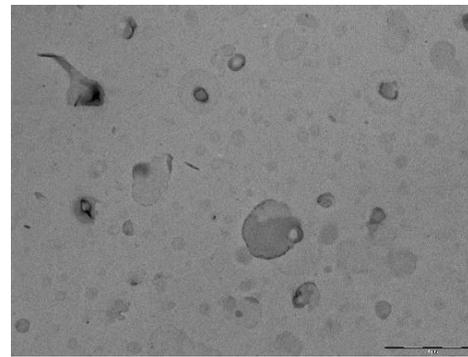
Myrj 52 Lyo. Scale: 500 nm PS ~135 nm



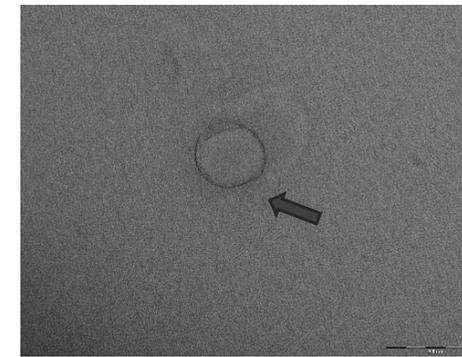
Myrj S100 Susp. Scale: 500 nm



Myrj S100 Susp. Scale: 200 nm PS ~110 nm



Myrj S100 Lyo. Scale: 1 μm



Myrj S100 Lyo. Scale: 200 nm PS ~140 nm

Figura 33. Imágenes TEM y análisis morfológico de nanopartículas PEGiladas y sin PEGilar, suspendidas sin liofilizar y liofilizadas. Abreviaturas: Susp., nanopartículas suspendidas en solución acuosa sin liofilizar; Lyo., nanopartículas liofilizadas; CO, colesteryl oleato correspondiente a la formulación sin PEG. Las flechas grises indican el tamaño de partícula (PS).

Tabla 10. Comparación de las características fisicoquímicas entre nanopartículas suspendidas en medio acuoso sin liofilizar, liofilizadas sin filtrar y liofilizadas filtradas con y sin PEG.

PEG ^a (150 mg)	PSD ^b (nm)	Pdl	ZP (mV)	PSD (nm)	Pdl	ZP (mV)	PSD (nm)	Pdl	ZP (mV)
SLNs Suspendidas Sin Liofilizar			SLNs Liofilizadas Sin Filtrar			SLNs Liofilizadas Filtradas			
Brij S100	190.9	0.096	25.1	334.4	0.337	25.9	315.1	0.199	28.0
DSPE	171.5	0.131	27.5	265.9	0.334	25.9	234.6	0.190	36.9
Gelucire	171.2	0.155	27.4	308.1	0.441	26.3	211.1	0.225	32.6
Myrj 52	183.1	0.187	31.4	274.2	0.399	31.7	280.0	0.256	31.6
Myrj S100	180.1	0.138	27.4	249.0	0.225	23.7	235.9	0.180	29.5
CO	202.1	0.169	37.4	231.2	0.276	42.5	235.3	0.194	44.1

^a CO representa 300 mg de colesterol oleato correspondiente a la formulación sin PEG.

^b Distribución del tamaño de partícula (PSD), índice de polidispersidad (Pdl) y potencial zeta (ZP) de todas las formulaciones fabricadas.

Sin embargo, no se encontraron diferencias en el tamaño de partículas entre las SLNs liofilizadas filtradas y sin filtrar de las formulaciones con Brij S100 y Myrj 52, ni las CO-SLN, por lo que puede no ser necesario utilizar un método de filtración para eliminar los agregados. En el resto de PEGs (DSPE, Gelucire y Myrj S100) se observó una reducción significativa del tamaño de partícula, lo que indica el efecto positivo que tuvo el método de filtración (Figura 34A).

Con respecto al Pdl, no se encontraron diferencias significativas entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar y las liofilizadas filtradas de las formulaciones con Gelucire y los dos Myrj, 52 y S100, sugiriendo que el método de filtración podría ser una solución potencial para obtener SLNs libres, que no se hayan unido entre sí formando agregados. Sin embargo, a pesar de la filtración, los otros dos PEGilados (Brij S100 y DSPE) presentaron diferencias significativas, incluidas las CO-SLN, recalando que no es suficiente solamente con filtrar las PEG-cSLN, sino que se requiere mejorar los parámetros que se llevan a cabo durante todo el proceso de liofilización. No obstante, cabe resaltar que la filtración ayuda significativamente a reducir el tamaño de las partículas, eliminando agregados y mejorando la monodispersidad. Esto se refleja al comparar las PEG-cSLN liofilizadas sin filtrar con las filtradas, excepto en la formulación con Myrj S100, a pesar de que el valor de Pdl es menor que el de los SLN sin filtrar (Figura 34B).

En cuanto al potencial zeta (ZP), se observó un aumento en todas las formulaciones excepto en la formulación con Myrj 52 (Tabla 10). Este incremento sugiere que el método de filtración posiblemente contribuyó al aumento, ya que el potencial no se vio afectado por el proceso de liofilización. Esta observación se refleja en las CO-cSLN, donde el ZP

aumentó significativamente después de la liofilización, y aún más después de la filtración (Figura 34C).

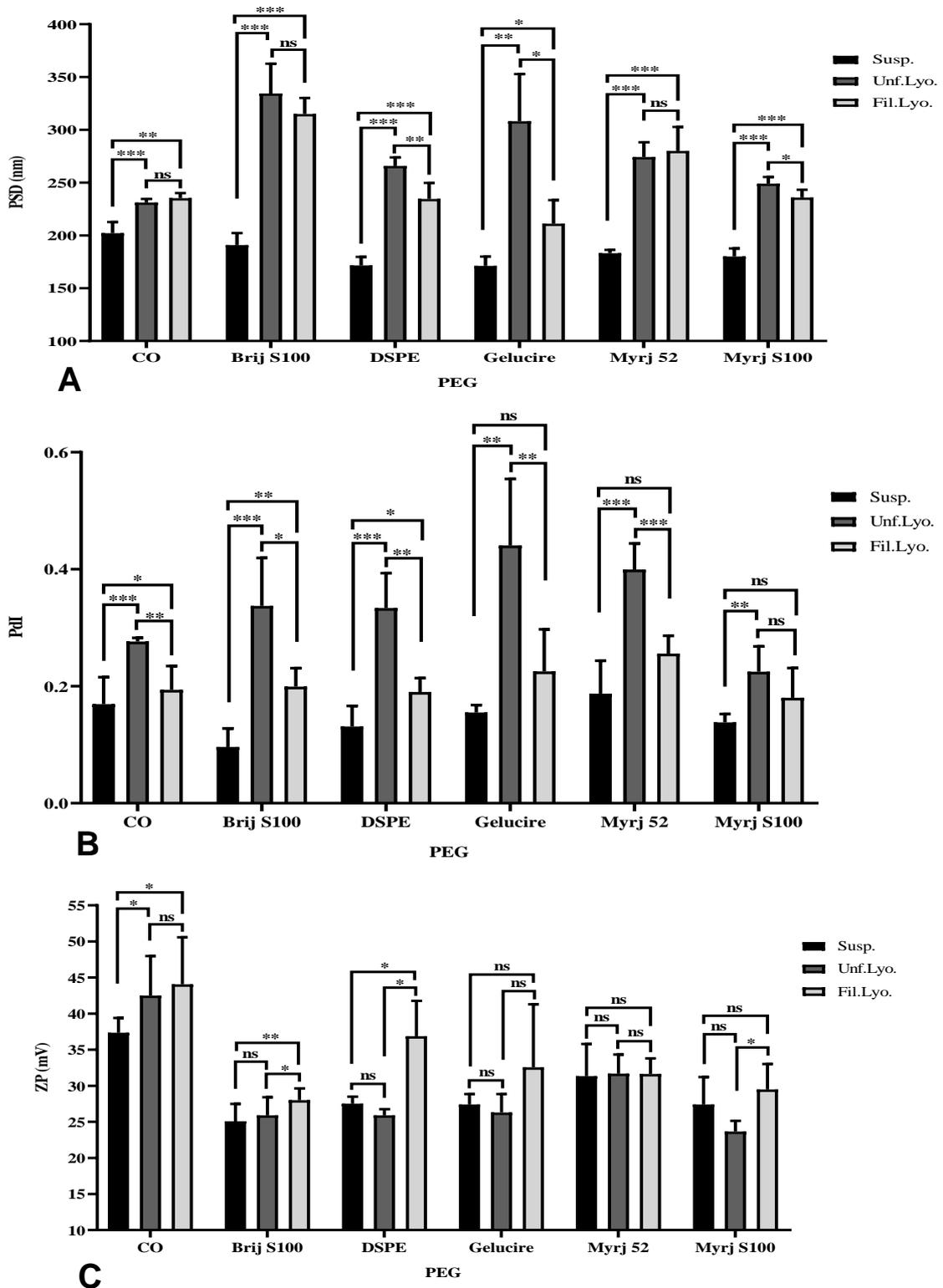


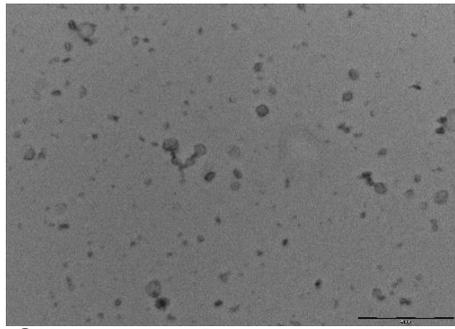
Figura 34. Análisis comparativo de la (A) distribución del tamaño de partícula (PSD), del (B) índice de polidispersidad (Pdl) y del (C) potencial zeta (ZP) de nanopartículas sin PEG y con PEG suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.), liofilizadas sin filtrar (Unf.Lyo.) y liofilizadas filtradas (Fil.Lyo.). CO representa colesterol oleato correspondiente a la formulación sin PEG. El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

4.1.4.2 Agregados de las PEG-cSLN Suspendidas sin Liofilizar y Liofilizadas

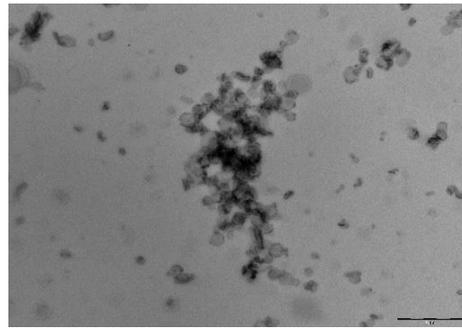
Las imágenes obtenidas por medio de microscopía por TEM, evidenciaron la presencia de agregados de las PEG-cSLNs en todas las formulaciones desarrolladas, tanto suspendidas en solución acuosa sin liofilizar como liofilizadas filtradas. Se pudo observar que existieron más aglomerados en las SLNs liofilizadas filtradas que en las SLNs suspendidas sin liofilizar de todas las formulaciones (Figura 35). Estos resultados demuestran el impacto del proceso de liofilización, que alteró bruscamente las características fisicoquímicas de éstas.

Después de la liofilización, se pudo observar que las PEG-cSLNs de las formulaciones que contienen DSPE, Gelucire y Myrj 52 todavía están incrustadas en la matriz de trehalosa que las protege contra las condiciones estresantes de la liofilización, pero también podrían estar aportando a la aglomeración de las nanopartículas, contribuyendo quizás a impedir que los PEG-cSLN se dispersen correctamente. Estos crioprotectores generalmente limitan el daño mecánico ejercido por la congelación, inhibiendo la agregación de partículas (150), pero parece que las PEG-cSLNs todavía están dentro de la matriz vítrea a pesar de que el estado sólido liofilizado se reconstituyó. Por ello, en la sección 4.1.4.4 se estudia el uso de distintos crioprotectores a distintas concentraciones para mejorar este punto.

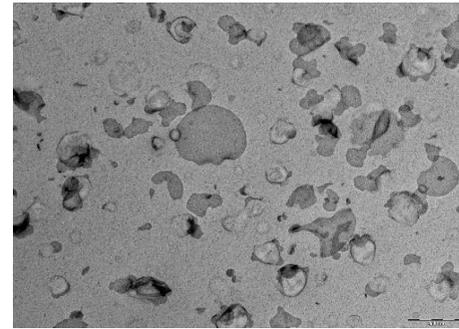
Sorprendentemente, las fuertes interacciones que existen entre las nanopartículas son evidentes en las imágenes de las SLN suspendidas sin liofilizar de las dos formulaciones que contienen Myrj (52 y S100). En este sentido, queda evidenciada la teoría de la estabilidad coloidal de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) que indica que fuerzas de atracción y repulsión actúan sobre las partículas en un medio acuoso (156). Por tanto, se producirá una agregación irreversible de nanopartículas cuando la distancia entre ellas sea lo suficientemente cercana como para que las fuerzas de atracción de Van der Waals sean mayores que las fuerzas electrostáticas y estéricas de repulsión que poseen las nanopartículas (151). A estos factores se le suma la gran área superficial que estos sistemas nanométricos poseen, lo que atribuye aún más a la poca estabilidad de las nanopartículas, pues contribuye a que estas nanoestructuras estén más cerca unas con otras ayudando a la aglomeración de éstas.



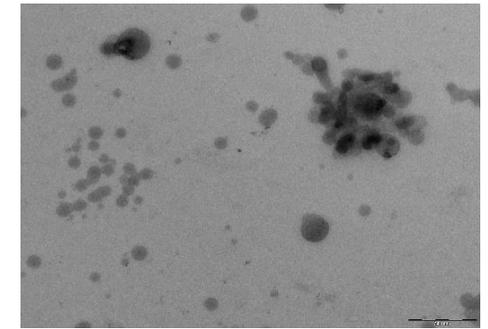
CO Susp.



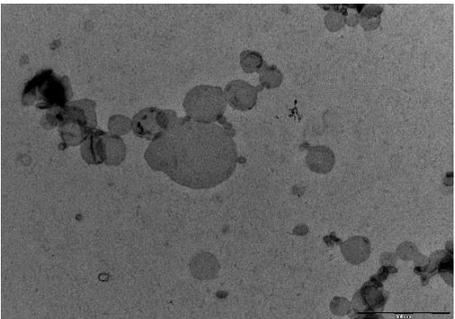
CO Lyo.



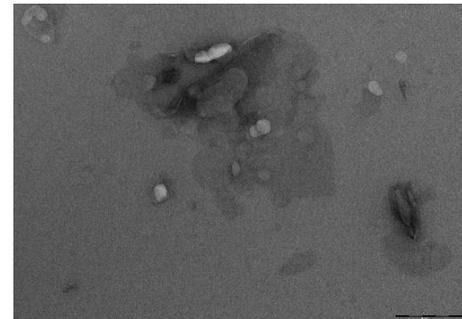
Brij S100 Susp.



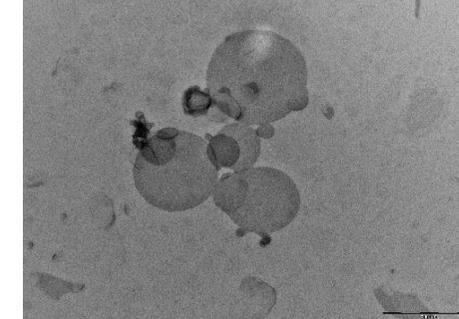
Brij S100 Lyo.



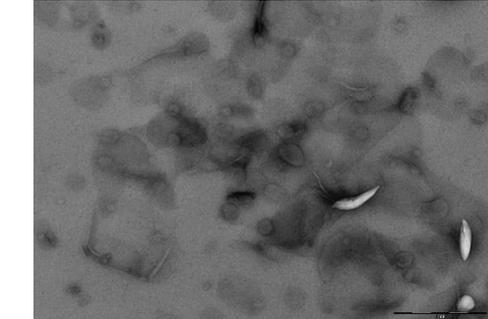
DSPE Susp.



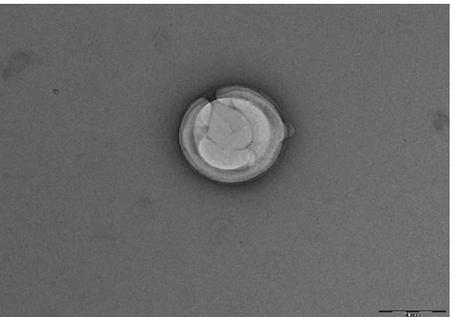
DSPE Lyo.



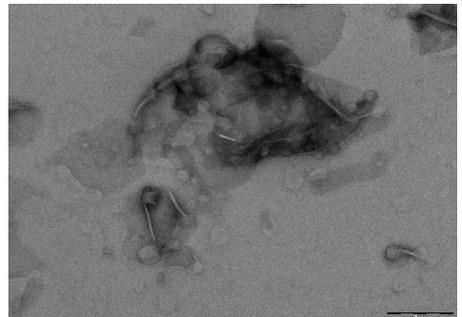
Gelucire Susp.



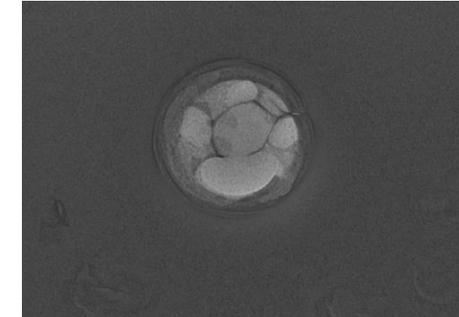
Gelucire Lyo.



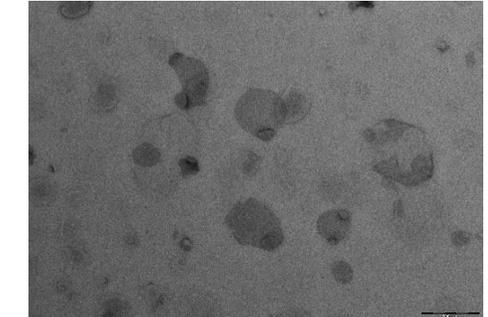
Myrj 52 Susp.



Myrj 52 Lyo.



Myrj S100 Susp.



Myrj S100 Lyo.

Figura 35. Imágenes TEM y análisis morfológico de nanopartículas aglomeradas PEGiladas y sin PEGilar, suspendidas sin liofilizar y liofilizadas. Abreviaturas: Susp., nanopartículas suspendidas en solución acuosa sin liofilizar; Lyo., nanopartículas liofilizadas; CO, colesteryl oleato correspondiente a la formulación sin PEG.

4.1.4.3 Estudio de los Parámetros Críticos del Proceso (CPP) de la Liofilización

Un exhaustivo estudio se llevó a cabo para lograr establecer los parámetros adecuados que sirvan para desarrollar un correcto proceso de liofilización dados los resultados inesperados (aumento del tamaño de partícula y Pdl) consecuencia del proceso sobre las PEG-cSLNs y, por ende, la necesidad de filtrar las suspensiones reconstituidas para poder eliminar la gran mayoría de agregados. Los resultados correspondientes al estudio de las características fisicoquímicas, morfológicas y biológicas de las PEG-cSLNs, detalladas en las secciones 4.1.1–4.1.3, 4.1.6 y 4.2.1–4.2.3, permitieron tener una visión más amplia sobre la idoneidad para escoger las mejores formulaciones y continuar con la optimización del proceso de liofilización, con el objetivo de reducir las diferencias observadas en las nanopartículas antes y después de liofilizarlas.

En consecuencia, de los cinco PEGs analizados en un principio, los dos Myrj (52 y S100) fueron escogidos para continuar con los respectivos ensayos concernientes al estudio y optimización de los CPPs del proceso de la liofilización. Adicionalmente, por tener un mejor HLB, se incorporaron dos nuevos excipientes PEGilados (Tefose 63 y 1500) en reemplazo del Gelucire.

En la actualidad, existe escasez de literatura científica que proporcione una guía completa para los científicos galénicos sobre cómo llevar a cabo con éxito la liofilización de nanopartículas, y que detalle el impacto de todos los parámetros del proceso de liofilización en su estabilidad (158,185). De este modo, para establecer una selección apropiada de parámetros operativos de la liofilización, se realizaron ensayos de velocidad de congelación, rampas de temperatura, variación de presión y duración del proceso. Los resultados mostraron que la optimización y el estudio del proceso de liofilización son cruciales para evitar la agregación irreversible de las PEG-cSLN, debido al inevitable estrés producido en el ciclo de liofilización. El ajuste de los diversos parámetros que tiene el proceso es muy importante para proteger las nanopartículas tanto de las bajas temperaturas como del vacío extremo que se requiere para que se lleve a cabo la sublimación.

Como ya se había mencionado en la sección 4.1.2 correspondiente a la liofilización, el paso de congelación es el más agresivo del proceso, debido a la formación de cristales de hielo que ejercen estrés mecánico en las moléculas, y está involucrado en el riesgo de producir agregación y/o coalescencia, causando efectos nocivos en la estabilidad de las nanopartículas (145,151,160). Para evitar la formación de cristales, se realizó una congelación rápida y se implementaron rampas de temperatura en el secado primario

que es el paso más trascendental en el proceso de liofilización, lo que contribuye a evitar la aglomeración de nanopartículas y por ende el aumento de tamaño de partícula. Es determinante conocer la temperatura de transición vítrea (T_g) de las muestras ya que se recomienda que la temperatura establecida en el secado primario esté por debajo de ésta.

Los parámetros como la temperatura y duración del proceso de las rampas #2 y #3 resultaron ser los procedimientos más adecuados para liofilizar las PEG-cSLNs (Myrj 52 y Tefose 1500). Aunque se observó un incremento mínimo en el tamaño de partícula (Tabla 11), esto indica una baja aglomeración de las nanopartículas. Claramente se puede observar que el proceso de liofilización afecta de manera independiente a cada formulación, puesto que cada PEG incorporado en la formulación determina las características fisicoquímicas propias de las SLNs. De este modo, se puede apreciar algunas diferencias al comparar los tamaños de partícula entre las PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar, las liofilizadas sin filtrar y las filtradas de los dos PEG utilizados (Myrj 52 y Tefose 1500).

En este sentido, no se encontraron diferencias significativas entre las PEG-cSLN liofilizadas sin filtrar con las filtradas de los dos PEG usados, tanto en el ciclo convencional como en las tres rampas de temperatura empleadas, salvo la rampa #3 del PEG Myrj 52 (Figura 36A y Figura 36B). Se pudo evidenciar que la rampa #2 correspondiente al Myrj 52 fue aquella que no presentaron diferencias significativas entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar, liofilizadas sin filtrar y las filtradas. Sin embargo, en el caso del PEG Tefose 1500, la rampa #3 fue la idónea, puesto que tampoco presentaron diferencias significativas entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar, las liofilizadas sin filtrar y las filtradas. Estos resultados confirman que el proceso de liofilización actúa de manera diferente en cada formulación establecida.

Referente al Pdl, se pudo evidenciar que una vez filtradas las PEG-cSLN liofilizadas, el Pdl de los PEGs utilizados se asemejó a un valor de 0.2. Asimismo, se observa que la rampa #2 fue la más idónea para liofilizar las SLNs con Myrj 52, debido a que no se encontraron diferencias significativas entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar, las liofilizadas sin filtrar y las filtradas, manteniéndose los Pdl con valores similares a 0.2 (Figura 37A). De igual forma, también en la rampa #2, no se observaron diferencias significativas entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar, las liofilizadas sin filtrar y las filtradas de las SLNs con Tefose 1500 (Figura 37B). Sin embargo, la rampa #3 fue la más idónea respecto al tamaño de partícula, por lo que es necesario realizar más ensayos para que tanto el tamaño como el Pdl se mantengan estables bajo las mismas

condiciones, y así garantizar que las propiedades fisicoquímicas no se vean afectadas por la liofilización.

Tabla 11. Comparación de las características fisicoquímicas entre nanopartículas suspendidas en medio acuoso, liofilizadas sin filtrar y liofilizadas filtradas con dos PEGs distintos sometidas a diferentes rampas de temperatura.

PEG	Rampa (T°) ^a	SLNs ^b	PSD ^c (nm)	Pdl	ZP (mV)	Difer. S vs. SF/F
Myrj 52	Receta Convencional	S	191.3	0.158	34.1	
		SF	268.6	0.392	NA	77.3
		F	259.8	0.274	33.5	68.5
	Rampa #1	S	205.3	0.170	33.97	
		SF	243.6	0.327	NA	38.3
		F	236.5	0.285	31.1	31.2
	Rampa #2	S	208.1	0.170	31.4	
		SF	214.7	0.203	NA	6.6
		F	221.6	0.238	39.9	13.5
	Rampa #3	S	211.0	0.183	28.4	
		SF	380.9	0.519	NA	169.9
		F	224.2	0.221	38.6	13.2
	Receta Convencional	S	149.7	0.166	39.2	
		SF	245.1	0.338	NA	95.4
		F	219.7	0.228	NA	70.0
Tefose 1500	Rampa #1	S	162.7	0.144	35.0	
		SF	207.4	0.262	NA	44.7
		F	208.3	0.224	37.9	45.6
	Rampa #2	S	174.8	0.160	31.2	
		SF	190.2	0.251	NA	15.4
		F	192.5	0.207	34.5	17.7
	Rampa #3	S	196.4	0.184	34.0	
		SF	203.3	0.321	NA	6.9
		F	196.4	0.217	44.8	0.0

^a Rampas de temperatura empleadas en el estudio (Rampa T°).

^b Nanopartículas suspendidas sin liofilizar (S), liofilizadas sin filtrar (SF) y liofilizadas filtradas (F).

^c Distribución del tamaño de partícula (PSD), índice de polidispersidad (Pdl), potencial zeta (ZP) de las formulaciones fabricadas, y diferencia (Difer.) entre los tamaños de partícula de las nanopartículas suspendidas (S) con las liofilizadas sin filtrar (SF) y las filtradas (F).

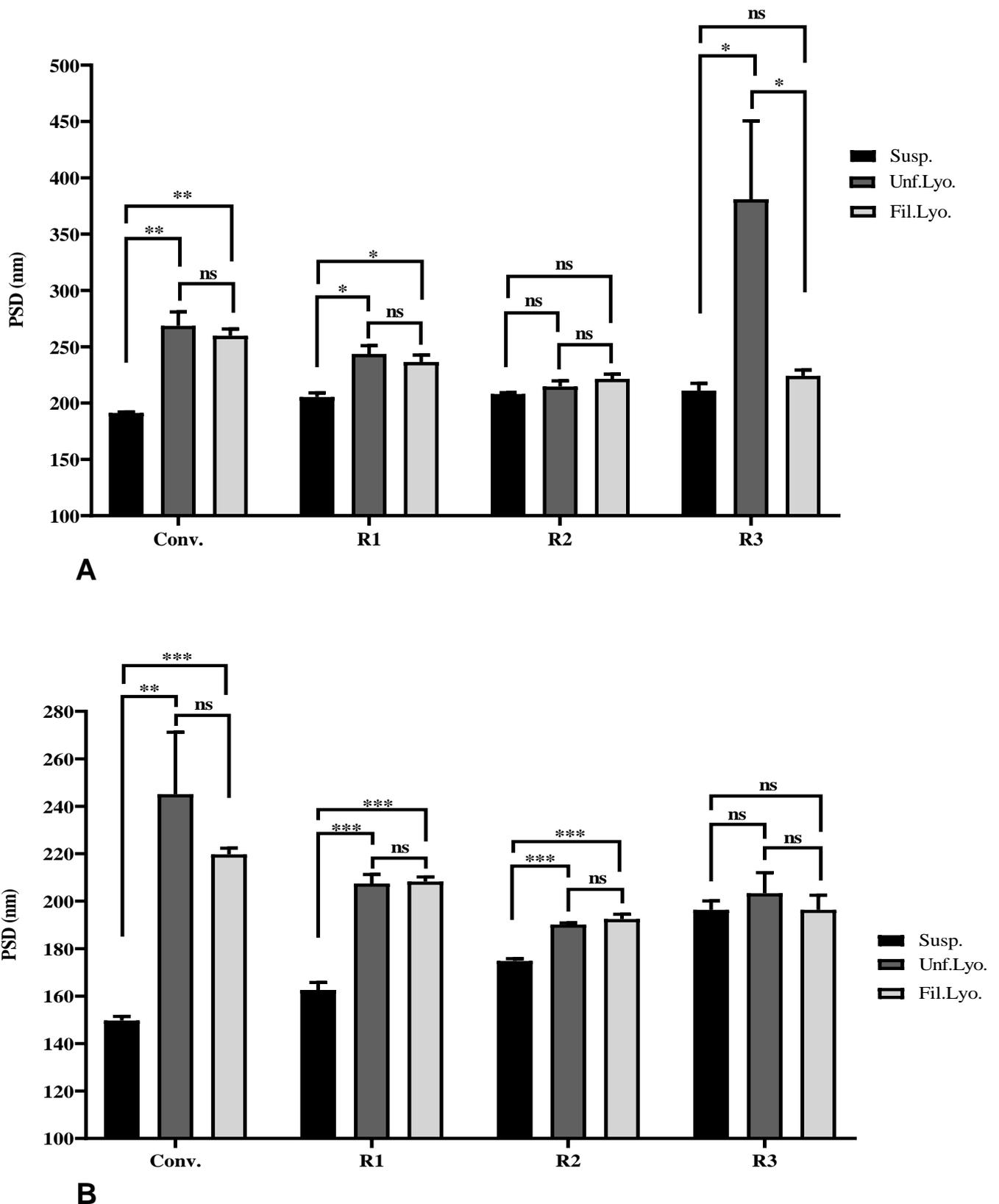


Figura 36. Análisis comparativo de la distribución del tamaño de partícula (PSD), de dos formulaciones con PEGs distintos, **(A)** Myrj 52 y **(B)** Tefose 1500, empleando diferentes rampas de temperatura (R1-R3). Conv, es la rampa convencional, detallada en la sección 3.2.1.2.2, empleada como control. PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.), liofilizadas sin filtrar (Unf.Lyo.) y liofilizadas filtradas (Fil.Lyo.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

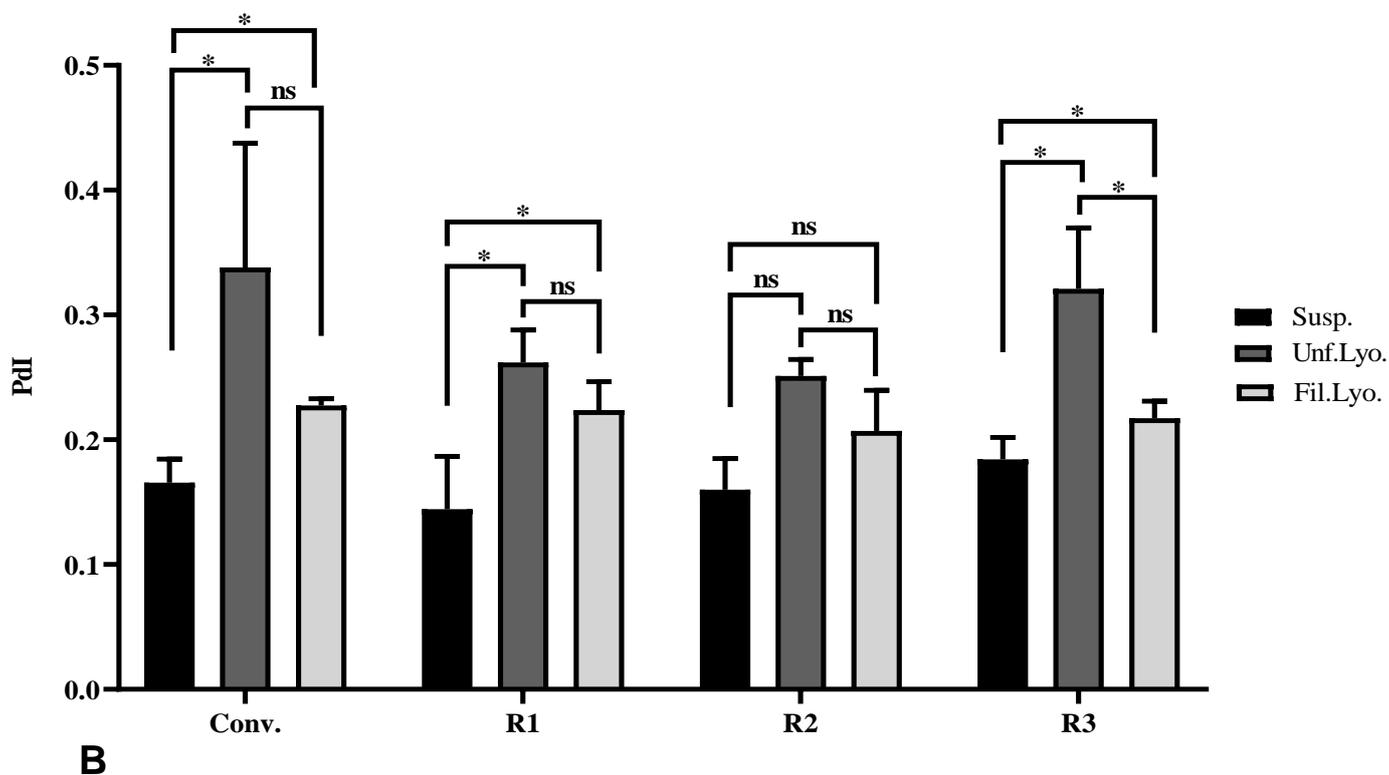
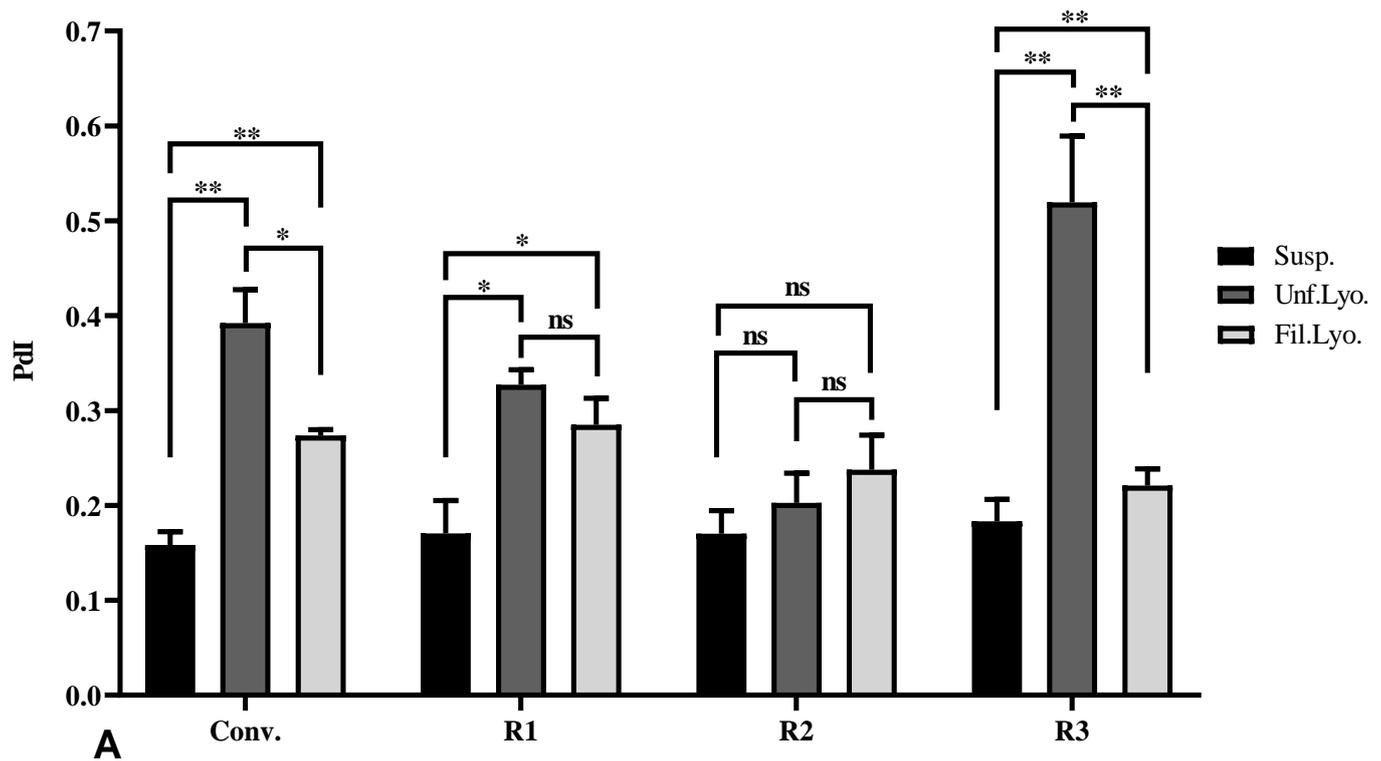


Figura 37. Análisis comparativo del índice de polidispersidad (PDI), de dos formulaciones con PEGs distintos, (A) Myrj 52 y (B) Tefose 1500, empleando diferentes rampas de temperatura (R1-R3). Conv, es la rampa convencional, detallada en la sección 3.2.1.2.2, empleada como control. PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.), liofilizadas sin filtrar (Unf.Lyo.) y liofilizadas filtradas (Fil.Lyo.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

En cuanto al potencial zeta, se observa un incremento del potencial, sobre todo en la rampa #3, en todas las condiciones evaluadas, excepto en la receta convencional y la rampa #1 de la formulación con Myrj 52 (Figura 38A y Figura 38B). Este factor implica una ventaja a la hora de formar los complejos con material genético. No obstante, cabe recalcar que, tanto en el ciclo convencional como en las rampas de temperatura empleadas, el ZP de todas las PEG-cSLN se mantuvo dentro del rango óptimo (20–45 mV) para formar los complejos. Además, estas rampas de temperatura fueron desarrolladas con un vacío de 0.3 mbar para, de esta manera, establecer un ciclo de liofilización que mantenga las propiedades fisicoquímicas de las SLNs, y que sean similares a las que tenían las suspendidas en medio acuoso sin liofilizar. Sin embargo, se realizaron ocho ensayos adicionales, en los cuales se varió el vacío (0.1–0.4 mbar; Anexo III, Tabla S3) para establecer el mejor parámetro que permita optimizar el proceso de liofilización.

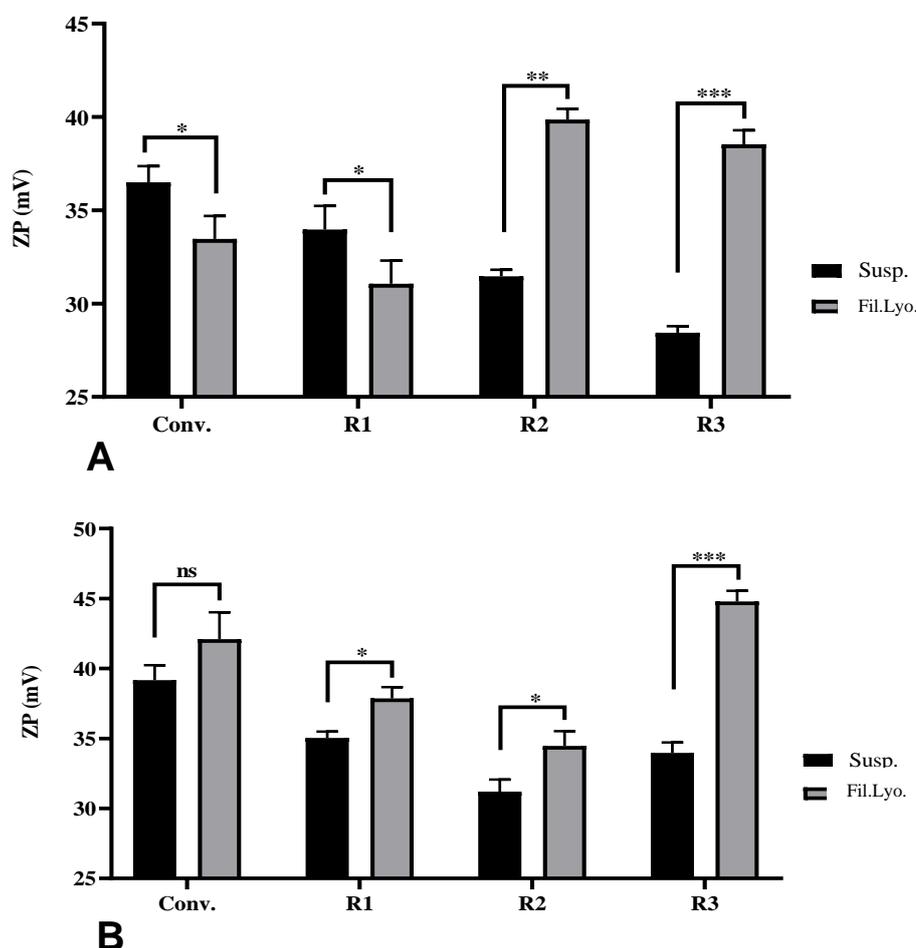


Figura 38. Análisis comparativo del potencial zeta (ZP), de dos formulaciones con PEGs distintos, (A) Myrj 52 y (B) Tefose 1500, empleando diferentes rampas de temperatura (R1-R3). Conv, es la rampa convencional, detallada en la sección 3.2.1.2.2, utilizada como control. PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.) y liofilizadas filtradas (Fil.Lyo.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

Como resultado, la variación del vacío afectó el tamaño de partícula de manera diferente entre las dos formulaciones, siendo así, que el tamaño de partícula en la formulación con Myrj 52 fue estable a 0.35 mbar, tanto las PEG-cSLN suspendidas como las liofilizadas sin filtrar y las filtradas (Figura 39A). Por otro lado, el tamaño de partícula en la formulación con Tefose 1500 se mantuvo estable con un vacío de 0.3 mbar, tanto las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar como las liofilizadas sin filtrar y las filtradas (Figura 39B).

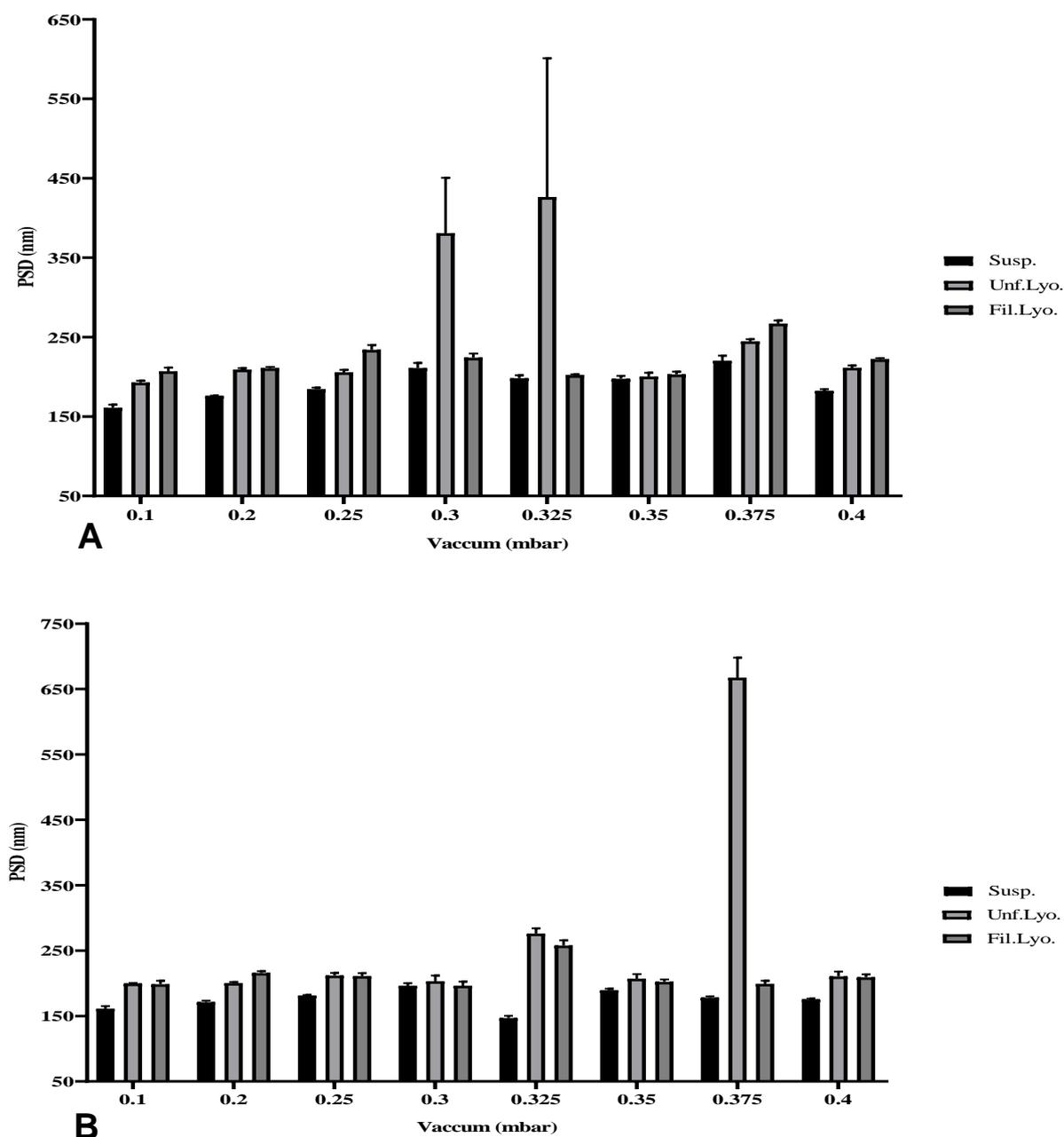


Figura 39. Análisis comparativo de la distribución del tamaño de partícula (PSD), de dos formulaciones con PEGs distintos, (A) Myrj 52 y (B) Tefose 1500, empleando distintos vacíos (0.1–0.4 mbar). PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.), liofilizadas sin filtrar (Unf.Lyo.) y liofilizadas filtradas (Fil.Lyo.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

De igual forma, los Pdl's fueron diferentes entre las dos formulaciones, siendo la formulación con Myrj 52 la que no presentó variación entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar, las liofilizadas sin filtrar y las filtradas empleando un vacío de 0.35 mbar (Figura 40A), confirmando que mediante el empleo de este vacío los dos parámetros (tamaño de partícula y Pdl) se mantienen estables con este PEG utilizado. No obstante, necesariamente se deben filtrar las PEG-cSLN reconstituidas de las dos formulaciones al emplear un vacío de 0.3 mbar para obtener un Pdl igual a 0.2, sobre todo la formulación con Tefose 1500 (Figura 40B).

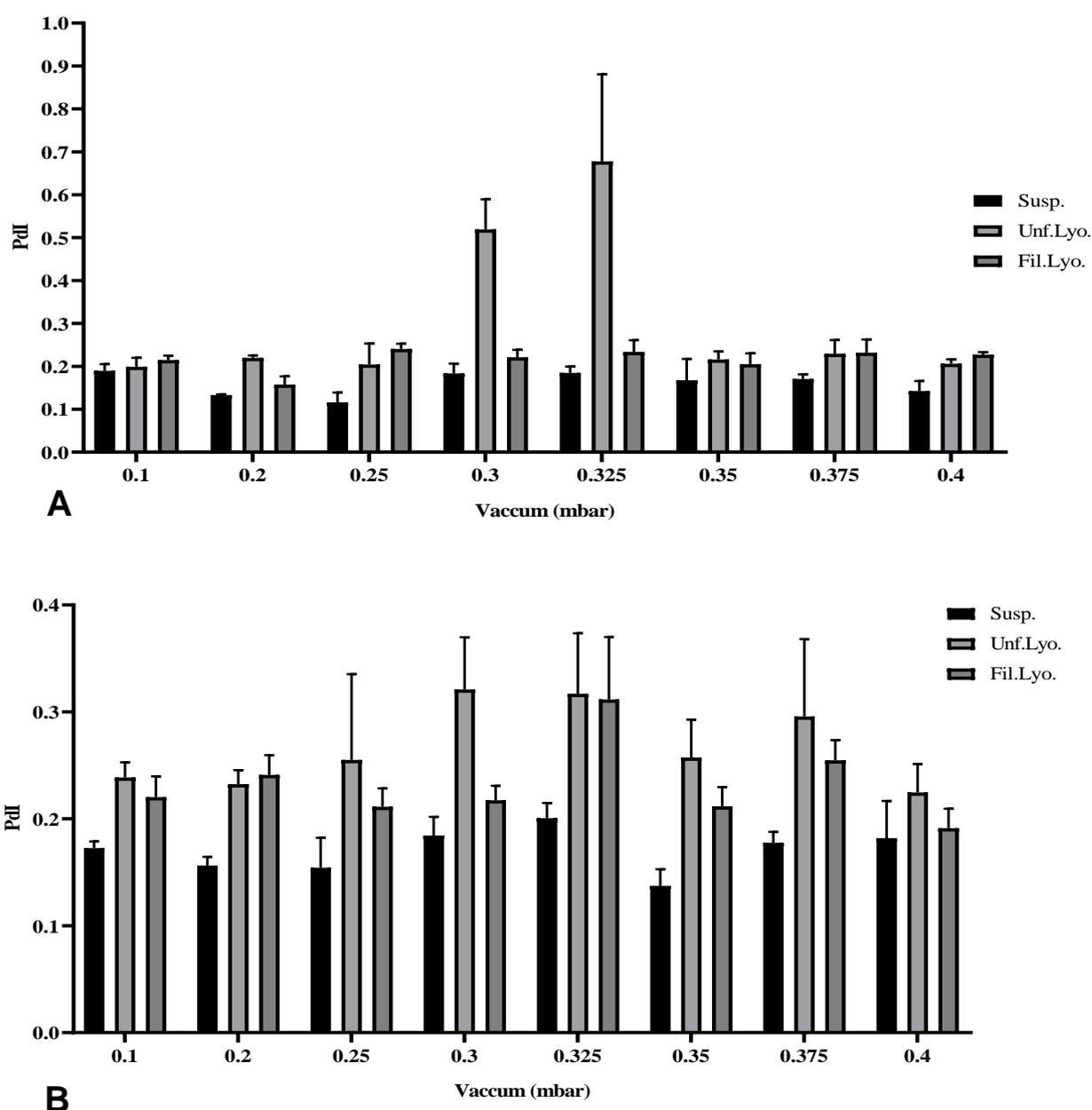


Figura 40. Análisis comparativo del índice de polidispersidad (Pdl), de dos formulaciones con PEGs distintos, (A) Myrj 52 y (B) Tefose 1500, empleando distintos vacíos (0.1–0.4 mbar). PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.), liofilizadas sin filtrar (Unf.Lyo.) y liofilizadas filtradas (Fil.Lyo.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

Dado que los resultados reflejan que las características fisicoquímicas se pueden mantener bajo condiciones de vacío entre 0.3 y 0.35 mbar, se procedió a realizar cuatro liofilizaciones adicionales, que consistieron en pruebas que impliquen una reducción del tiempo de congelación y procesos de secado primario más prolongados, empleando cuatro condiciones de vacío diferentes (0.3, 0.325, 0.35 y 0.375 mbar). Nuevamente, el proceso de liofilización afectó a las formulaciones de manera independiente (Tabla 12).

Tabla 12. Comparación de las características fisicoquímicas entre nanopartículas suspendidas en medio acuoso sin liofilizar, liofilizadas sin filtrar y liofilizadas filtradas con dos PEGs distintos sometidas a diferentes vacíos.

PEG	Vacío (mbar)	SLNs ^a	PSD (nm) ^b	Pdl	ZP (mV)	Difer. S vs. SF/F
Myrj 52	0.300	S	229.4	0.134	36.8	17.0
		SF	246.4	0.183		
		F	266.5	0.213		
	0.325	S	238.4	0.149	33.1	39.4
		SF	277.8	0.110		
		F	253.2	0.205		
	0.350	S	242.3	0.117	33.3	118.7
		SF	361.0	0.182		
		F	265.2	0.180		
	0.375	S	234.9	0.164	36.0	43.7
		SF	278.6	0.406		
		F	289.7	0.255		
Tefose 1500	0.300	S	203.5	0.191	43.0	-14.0
		SF	202.8	0.263		
		F	189.5	0.224		
	0.325	S	206.5	0.201	41.3	254.1
		SF	460.6	0.642		
		F	184.1	0.212		
	0.350	S	211.7	0.164	39.2	73.8
		SF	285.5	0.671		
		F	185.7	0.183		
	0.375	S	211.4	0.149	22.9	54.5
		SF	265.9	0.451		
		F	191.9	0.242		

^a Nanopartículas suspendidas sin liofilizar (S), liofilizadas sin filtrar (SF) y liofilizadas filtradas (F)

^b Distribución del tamaño de partícula (PSD), índice de polidispersidad (Pdl), potencial zeta (ZP) de las formulaciones fabricadas, y diferencia (Difer.) entre los tamaños de partícula de las nanopartículas suspendidas sin liofilizar (S) con las liofilizadas sin filtrar (SF) y las filtradas (F).

De tal modo, se puede observar que con un vacío de 0.3 mbar existe un ligero incremento en el tamaño de partícula entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar y las liofilizadas sin filtrar, correspondientes a la formulación con Myrj 52, en comparación con las otras condiciones de vacío evaluadas (Figura 41A). Por el contrario, empleando el mismo vacío, no se encontraron diferencias significativas del tamaño de partícula entre

las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar y las liofilizadas sin filtrar correspondiente a la formulación con Tefose 1500 (Figura 41B).

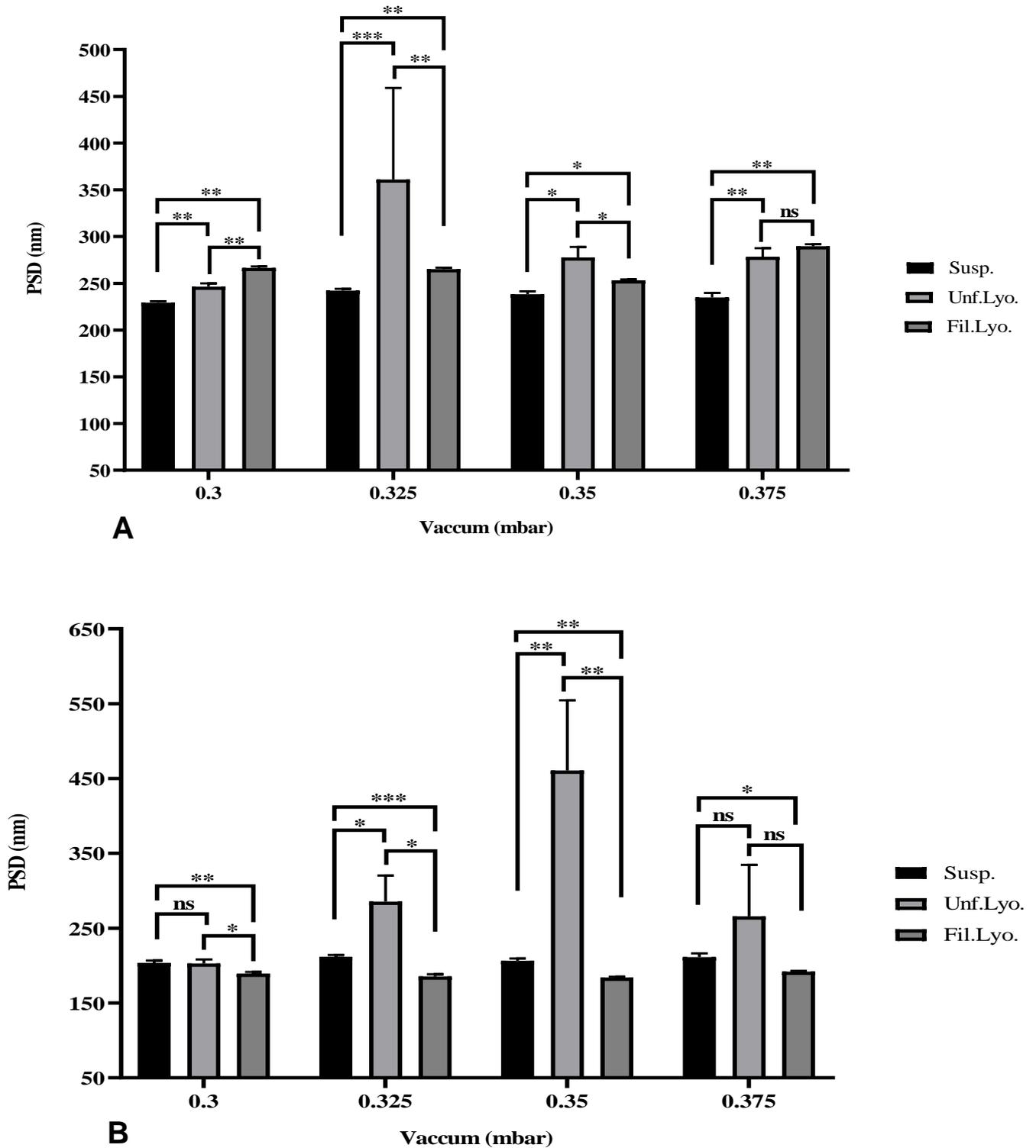


Figura 41. Análisis comparativo de la distribución del tamaño de partícula (PSD) de dos formulaciones con PEGs distintos, **(A)** Myrj 52 y **(B)** Tefose 1500, empleando distintos vacíos (0.3–0.375 mbar). PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.), liofilizadas sin filtrar (Unf.Lyo.) y liofilizadas filtradas (Fil.Lyo.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

Se puede observar que a un vacío de 0.375 mbar no se presentan diferencias significativas del tamaño de partícula entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar y las liofilizadas sin filtrar, a pesar de que se puede evidenciar claramente un incremento en el tamaño de partícula. Asimismo, a un vacío de 0.3 mbar tampoco se observaron diferencias significativas en el PSD. Es curioso que al comparar el tamaño de partícula entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar con las liofilizadas filtradas existan diferencias significativas.

En cuanto al Pdl, no se encontraron diferencias significativas empleando condiciones de vacío de 0.3, 0.325 y 0.35 mbar, entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar y las liofilizadas sin filtrar correspondiente a la formulación con Myrj 52, siendo el vacío a 0.325 el cual no presentó diferencias entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar y liofilizadas sin filtrar y filtradas (Figura 42A). Adicionalmente, con un vacío de 0.3 mbar tampoco se encontraron diferencias significativas entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar, las liofilizadas sin filtrar y las filtradas correspondiente a la formulación con Tefose 1500, confirmando así que el vacío óptimo para mantener las características fisicoquímicas de las nanopartículas es de 0.3 mbar (Figura 42B). Cabe mencionar que, en todas las condiciones de vacío evaluadas, las PEG-cSLN filtradas presentaron Pdl's similares a las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar. Este resultado es relevante puesto que evidencia que la implementación de rampas de temperatura y duración del proceso, junto con un vacío determinado, son importantes para mantener las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas.

Estos resultados indican que se han establecido los parámetros del proceso de liofilización, proponiendo las condiciones para el ciclo de liofilización empleadas en las rampas #2 y #3 con un vacío de 0.3 mbar, ya que arrojaron los mejores resultados. Sin embargo, se continúa filtrando las PEG-cSLN para eliminar posibles agregados, lo que sugiere que todavía el estrés provocado por el proceso sigue afectando la estabilidad de las nanopartículas. Por esta razón, se realizaron ensayos con diferentes tipos de crioprotectores y/o lioprotectores, así como también se probaron diferentes concentraciones de éstos, pues se ha reportado que mientras más crioprotector presenten las suspensiones con nanopartículas, mayor es la protección que generan, ayudando a estabilizar las partículas contra el estrés de la congelación y del secado, reduciendo la agregación, acortando el tiempo de reconstitución y disminuyendo la humedad residual (145,151). En la siguiente sección se detallan los resultados obtenidos al utilizar diferentes crioprotectores y el establecimiento de la concentración adecuada del mismo.

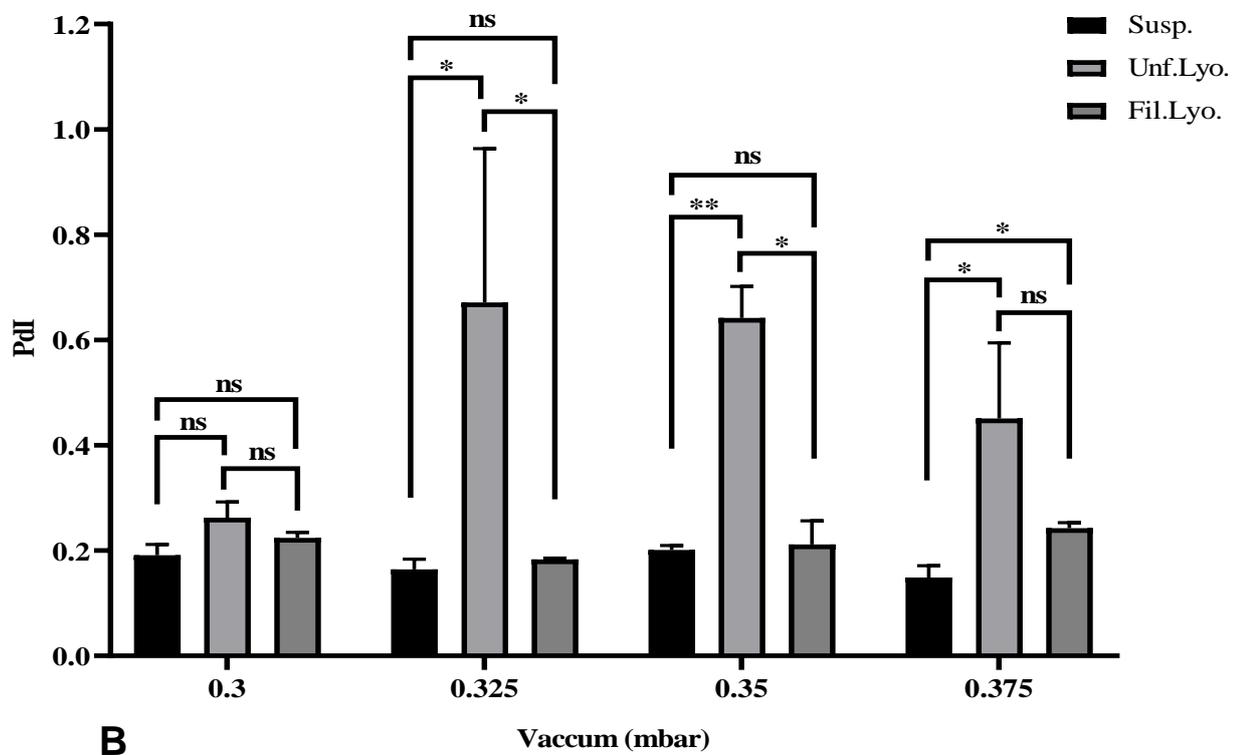
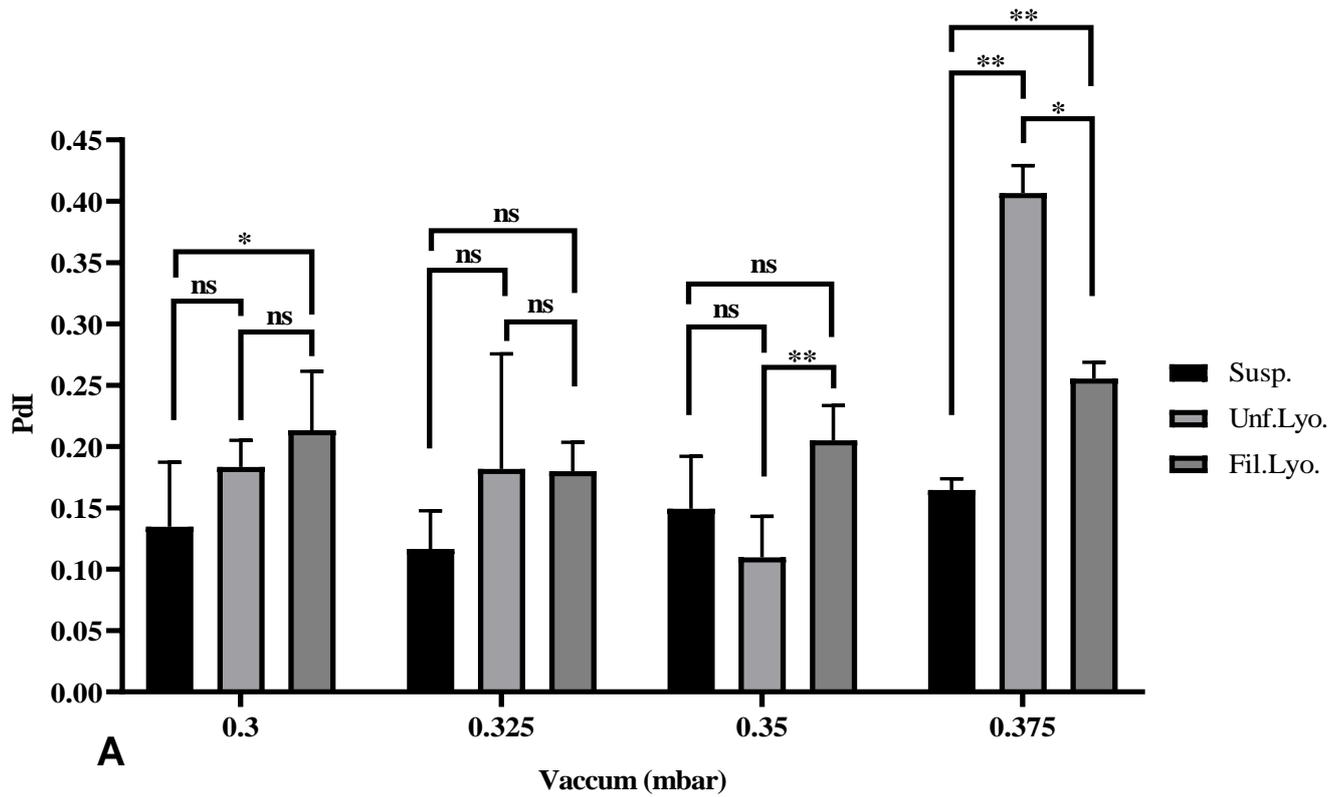


Figura 42. Análisis comparativo del índice de polidispersidad (Pdl) de dos formulaciones con PEGs distintos, (A) Myrj 52 y (B) Tefose 1500, empleando distintos vacíos (0.3–0.375 mbar). PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.), liofilizadas sin filtrar (Unf.Lyo.) y liofilizadas filtradas (Fil.Lyo.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

4.1.4.4 Evaluación de Crioprotectores

Una vez evaluados los parámetros del proceso de liofilización, se analizaron tres diferentes crioprotectores (sacarosa, trehalosa y sucralosa) con tres diferentes PEGs (Myrj S100 y los Tefoses 63 y 1500), para de esta manera, determinar el mejor disacárido que pueda proteger a las nanopartículas, y así, prescindir de la necesidad de filtrar las PEG-cSLNs para eliminar posibles agregados y obtener poblaciones monodispersas (Anexo III, Tabla S4). A pesar de que se encontraron diferencias significativas con el tamaño de partícula en comparación con las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar correspondiente a cada PEGilado, los resultados reflejan que el mejor crioprotector utilizado con todos los PEGs probados, fue la sacarosa (Figura 43A). Del mismo modo, la sacarosa fue el mejor crioprotector para mantener los Pdl's similares a valores de 0.2, excepto en la formulación con Tefose 1500, cuyo Pdl fue significativamente superior comparado con las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar (Figura 43B). Por último, el potencial zeta, en todos los PEG utilizados y con todos los crioprotectores probados, se mantuvo dentro del rango óptimo (20–45 mV) para formar los complejos con material genético (Figura 43C).

Una vez establecido el crioprotector más adecuado (sacarosa) para proteger las PEG-cSLNs frente las condiciones estresantes que conlleva la liofilización, se procedió a determinar la concentración más efectiva que mantenga intactas las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas. De esta forma, se evaluaron cuatro concentraciones diferentes de sacarosa (5%, 10%, 15% y 20%), de las cuales, el mejor resultado obtenido fue al emplear una concentración del 20% en todos los PEGs utilizados (Tabla S4). Cabe recalcar que, con esta concentración, el tamaño de partícula de las PEG-cSLNs liofilizadas sin filtrar fue el más pequeño en todos los PEGs analizados. Incluso en la formulación con Tefose 1500, no se observaron diferencias significativas en comparación con las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar (Figura 44A). De igual forma, los Pdl's de todos los PEGs analizados, se mantuvieron con valores similares a 0.2 utilizando una concentración del 20% de sacarosa (Figura 44B).

Con el crioprotector establecido y con una concentración potencialmente efectiva, se evaluaron dos concentraciones adicionales (25% y 30%) para verificar si aumentando la concentración del crioprotector se logran obtener mejores resultados, tanto en PEG-cSLNs liofilizadas sin filtrar como filtradas. Sin embargo, los resultados indicaron que el aumento de la concentración no ayudó a mejorar el tamaño de partícula ni evitar la aglomeración de las nanopartículas, excepto en la formulación con Myrj S100, la cual tuvo una disminución significativa del tamaño de partícula (Figura 45A).

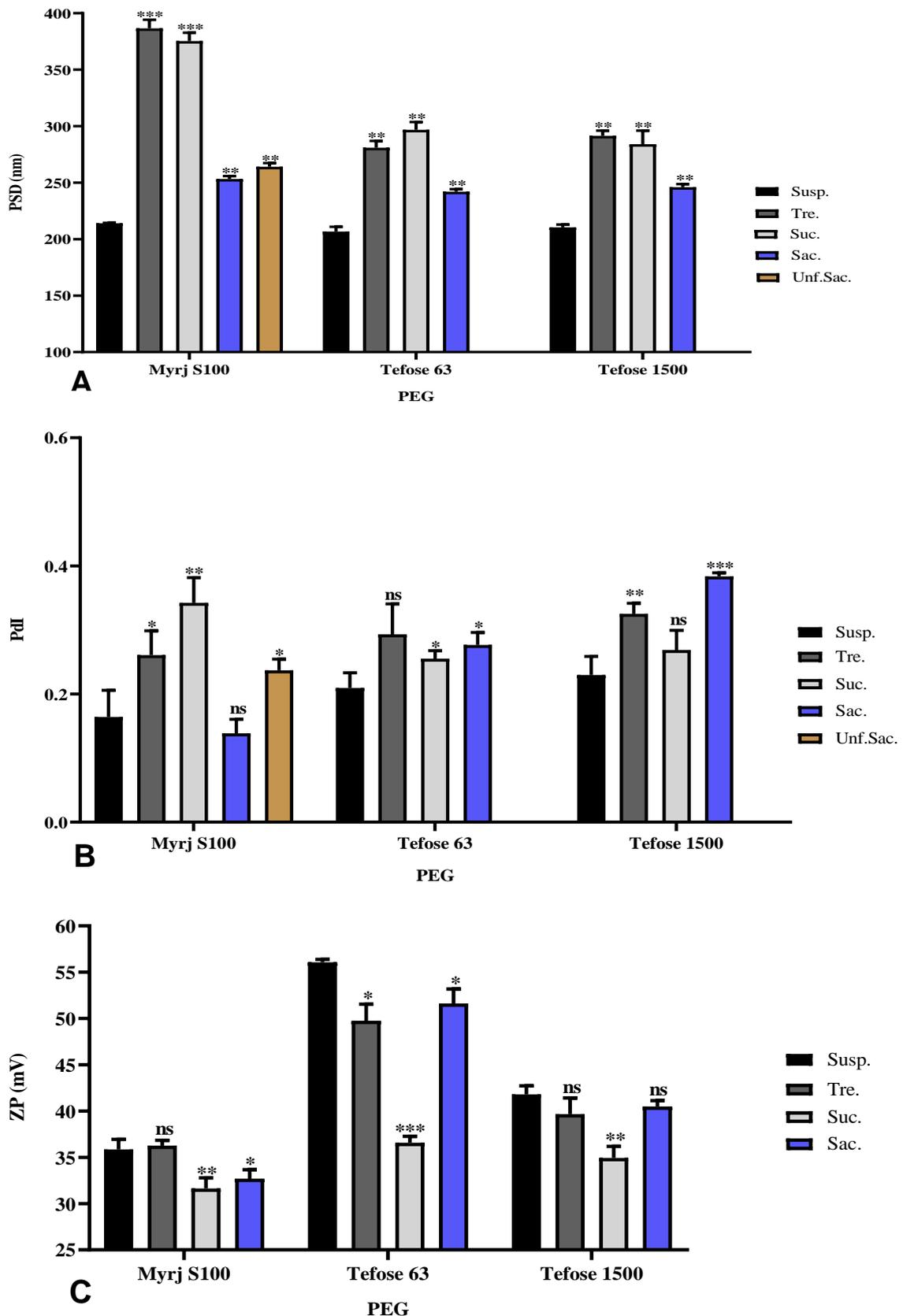


Figura 43. Análisis comparativo de la (A) distribución del tamaño de partícula (PSD), del (B) índice de polidispersidad (Pdl) y del (C) potencial zeta (ZP) de nanopartículas correspondientes a tres formulaciones con PEGs distintos, (Myrj S100, Tefose 63 y 1500), empleando diferentes crioprotectores: Trehalosa (Tre.), Sucralosa (Suc.) y Sacarosa (Sac.). PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

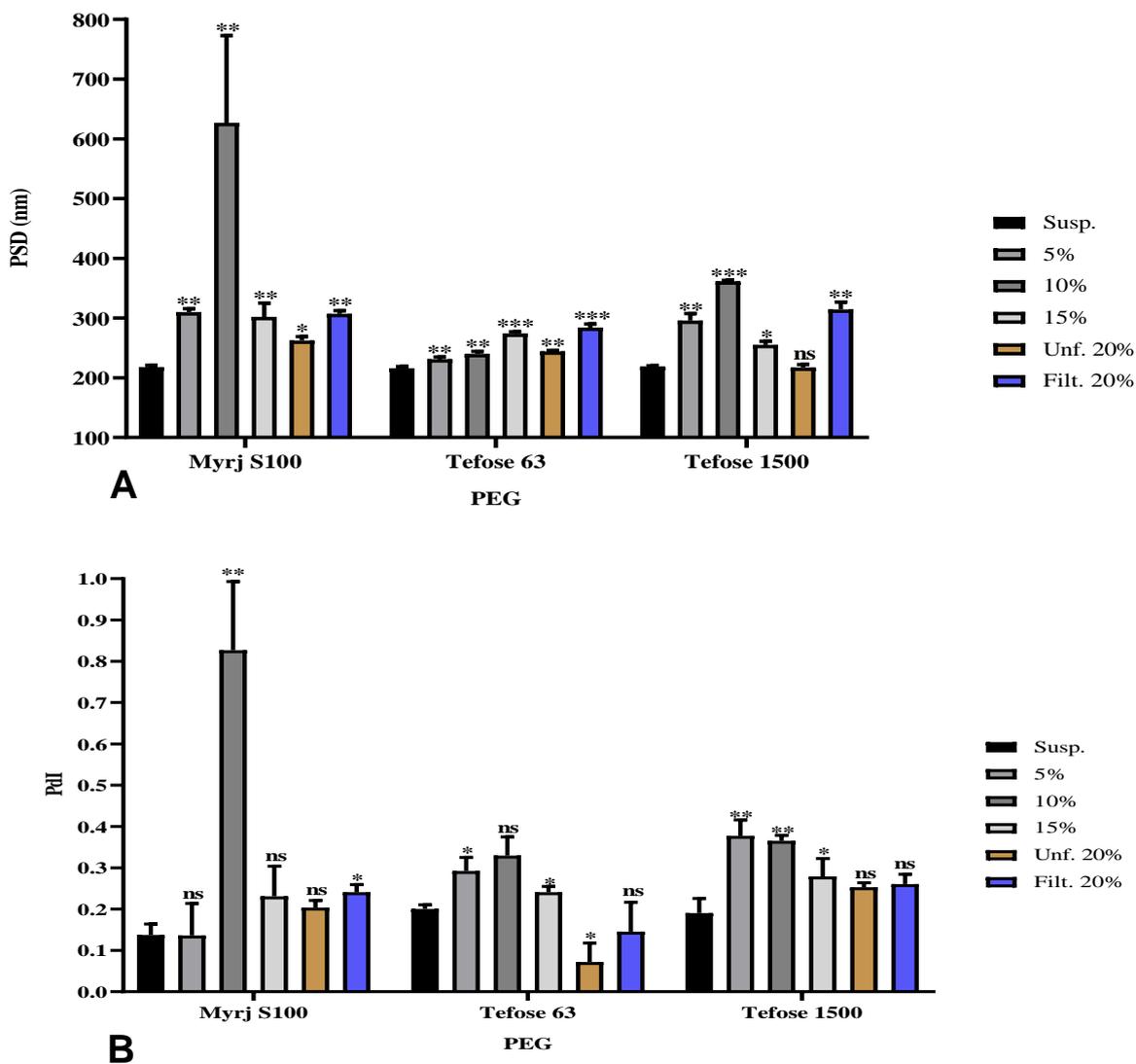


Figura 44. Análisis comparativo de la (A) distribución del tamaño de partícula (PSD) y del (B) índice de polidispersidad (Pdl) de nanopartículas correspondientes a tres formulaciones con PEGs distintos, (Myrj S100, Tefose 63 y 1500), empleando diferentes concentraciones (5%–20%) de sacarosa utilizada como crioprotector. PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.), liofilizadas sin filtrar (Unf.) y liofilizadas filtradas (Filt.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

Por otro lado, los Pdl de todos los PEGs analizados, con las dos nuevas concentraciones evaluadas, se mantuvieron con valores similares a 0.2, excepto en la formulación con Tefose 1500, cuyo Pdl fue mayor en las PEG-cSLN filtradas empleando una concentración del 30% (Figura 45B).

Por último, para confirmar la idoneidad de la concentración de 20% de crioprotector a la hora de liofilizar las nanopartículas, se comparó las PEG-cSLN liofilizadas filtradas y sin filtrar de los tres PEGilados analizados con las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar. Los resultados mostraron un incremento en el tamaño de partícula de los tres PEGs, excepto

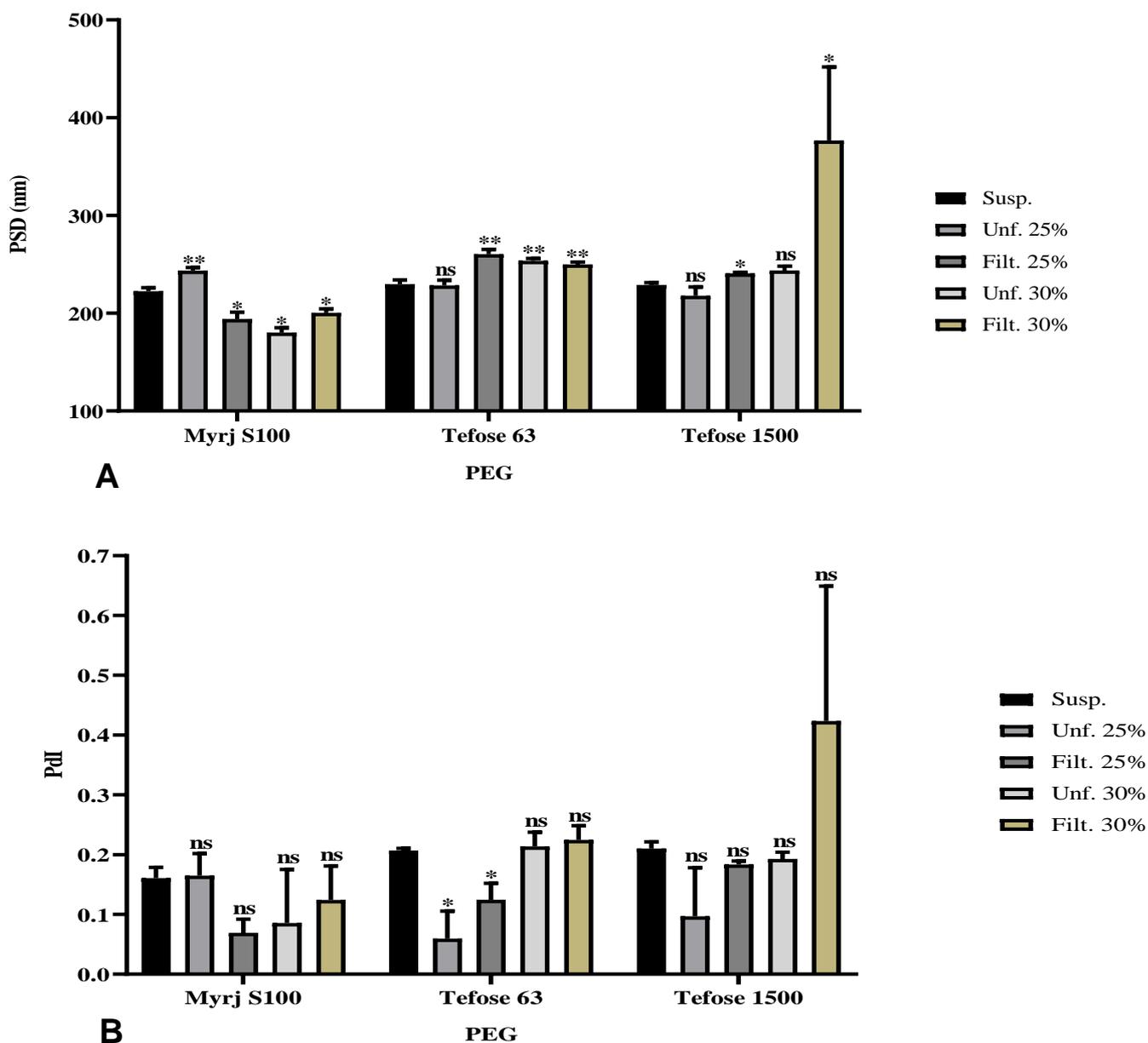


Figura 45. Análisis comparativo de la (A) distribución del tamaño de partícula (PSD) y del (B) índice de polidispersidad (Pdl) de nanopartículas correspondientes a tres formulaciones con PEGs distintos, (Myrj S100, Tefose 63 y 1500), empleando dos concentraciones (25% y 30%) distintas de sacarosa utilizada como crioprotector. PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.), liofilizadas sin filtrar (Unf.) y liofilizadas filtradas (Filt.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

en las PEG-cSLN liofilizadas filtradas de la formulación con Tefose 1500, ya que no se evidenciaron diferencias significativas (Figura 46A). En cuanto al Pdl, las PEG-cSLNs liofilizadas filtradas no presentaron diferencias significativas con respecto a las suspendidas sin liofilizar, manteniéndose valores similares a 0.2, excepto en la formulación con Tefose 63 (Figura 46B).

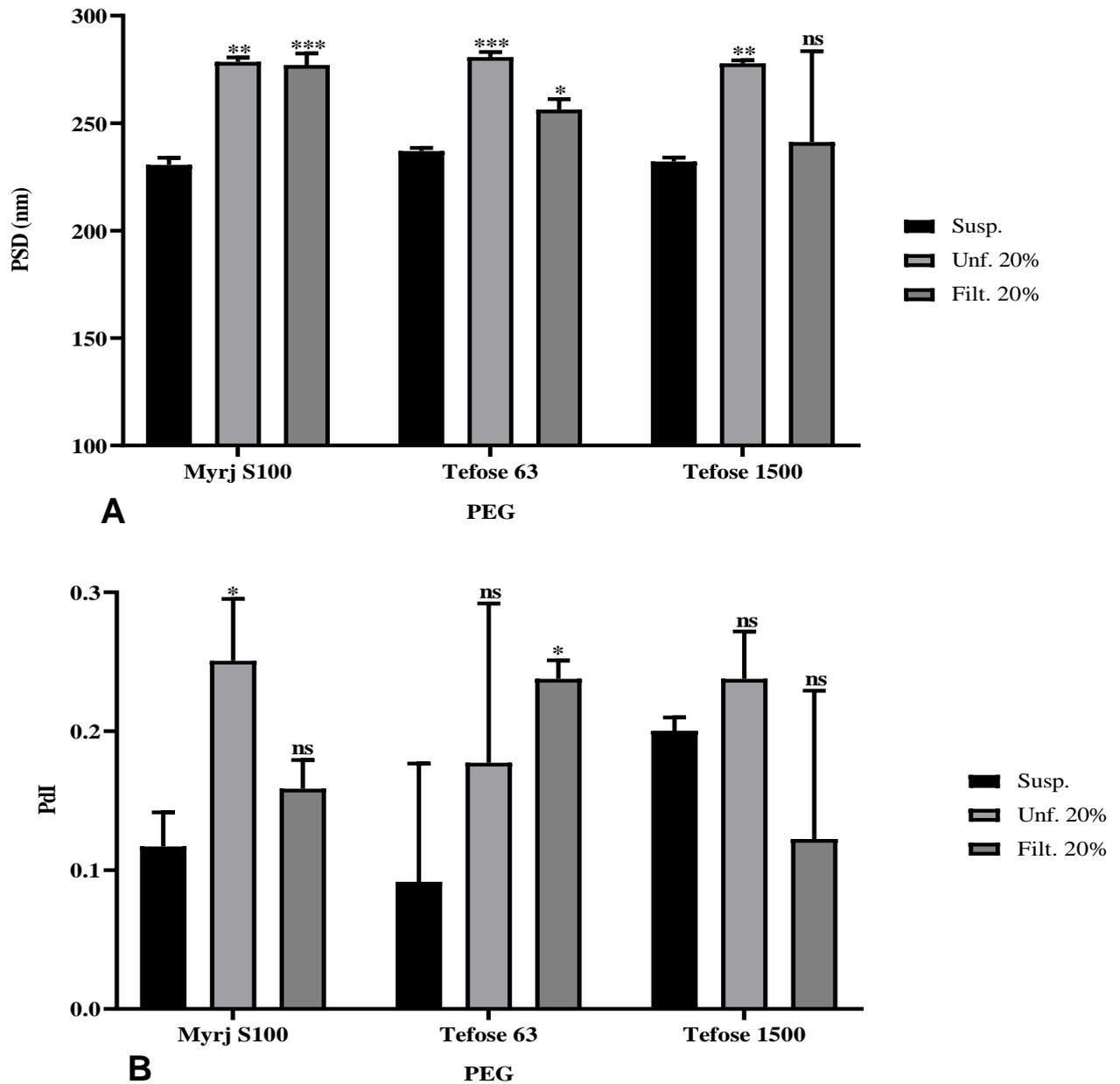


Figura 46. Análisis comparativo de la (A) distribución del tamaño de partícula (PSD) y del (B) índice de polidispersidad (Pdl) de nanopartículas correspondientes a tres formulaciones con PEGs distintos, (Myrj S100, Tefose 63 y 1500), empleando una concentración de 20% de sacarosa utilizada como crioprotector. PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.), liofilizadas sin filtrar (Unf.) y liofilizadas filtradas (Filt.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

Por otro lado, en la formulación con Tefose 1500 no se encontraron diferencias significativas entre las PEG-cSLNs liofilizadas sin filtrar y las filtradas comparándolas con las suspendidas sin liofilizar. A pesar de que se ha determinado a la sacarosa como el mejor crioprotector, y que una concentración del 20% es la más adecuada para liofilizar, aún persiste un aumento tanto en el tamaño de partícula como en el Pdl, indicando la aglomeración entre las nanopartículas a causa del estrés ejercido por la liofilización. Por esta razón, se procedió a optimizar el proceso de liofilización mediante

el perfeccionamiento del ciclo resultante del estudio de los CPPs (Sección 4.1.4.3), empleando un vacío de 0.3 mbar y aplicando una solución de sacarosa al 20% como crioprotector. Los detalles de la optimización de los CPPs de la liofilización se presentan en el siguiente apartado.

4.1.4.5 Optimización de los Parámetros Críticos del Proceso (CPP) de la Liofilización

Se procedió a optimizar el proceso de liofilización con el PEG Tefose 63 mediante la aplicación de seis rampas de temperatura diferentes. En estas rampas, se ajustaron parámetros como la temperatura y la duración del proceso, tanto en el secado primario como en el secundario, siendo esta la principal diferencia respecto al estudio de los CPPs detallado en la sección 4.1.4.3. Además, para la optimización del proceso, se adicionaron más valores de temperatura mientras se mantuvo constante el tiempo de duración del proceso, lo que permitió un secado más controlado y gradual.

De las seis rampas analizadas, en casi todas, el tamaño de partícula no varió significativamente al comparar las PEG-cSLN liofilizadas sin filtrar con las filtradas, excepto en las rampas #4 y #5 (Figura 47A; Anexo III, Tabla S5). La rampa #3 fue la única rampa que no presentó diferencias significativas entre las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar con las liofilizadas, tanto filtradas como sin filtrar. Esto quiere decir que bajo estos parámetros (Anexo IV; Figura S1), y con una solución de sacarosa al 20%, se logró sobrellevar el estrés ejercido por la liofilización hacia las nanopartículas con Tefose 63, siendo una potencial receta para evitar la aglomeración de las PEG-cSLN, aumentando su estabilidad e incrementando su vida útil. Por otro lado, en la rampa #4, tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar el tamaño de partícula de las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar con las liofilizadas filtradas, pero si existieron diferencias al comparar las PEG-cSLN liofilizadas sin filtrar con las suspendidas sin liofilizar y las liofilizadas filtradas.

En cuanto al Pdl, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las rampas analizadas al comparar las PEG-cSLN suspendidas sin liofilizar con las liofilizadas sin filtrar y las filtradas. No obstante, las rampas #3 y #4 presentaron valores similares a 0.2, mientras que las otras excedían este valor, presentando polidispersión en la población de las nanopartículas (Figura 47B). Cabe recalcar, que bajo las condiciones de la rampa #4, el Pdl de las PEG-cSLN liofilizadas sin filtrar presentaron tamaño de partícula similares a las suspendidas sin liofilizar. Inclusive, la polidispersión presentada

por las PEG-cSLN filtradas fue cercano a un valor inferior a 0.2, reflejando de esta manera que se logró evitar en cierto modo el estrés ejercido por la liofilización.

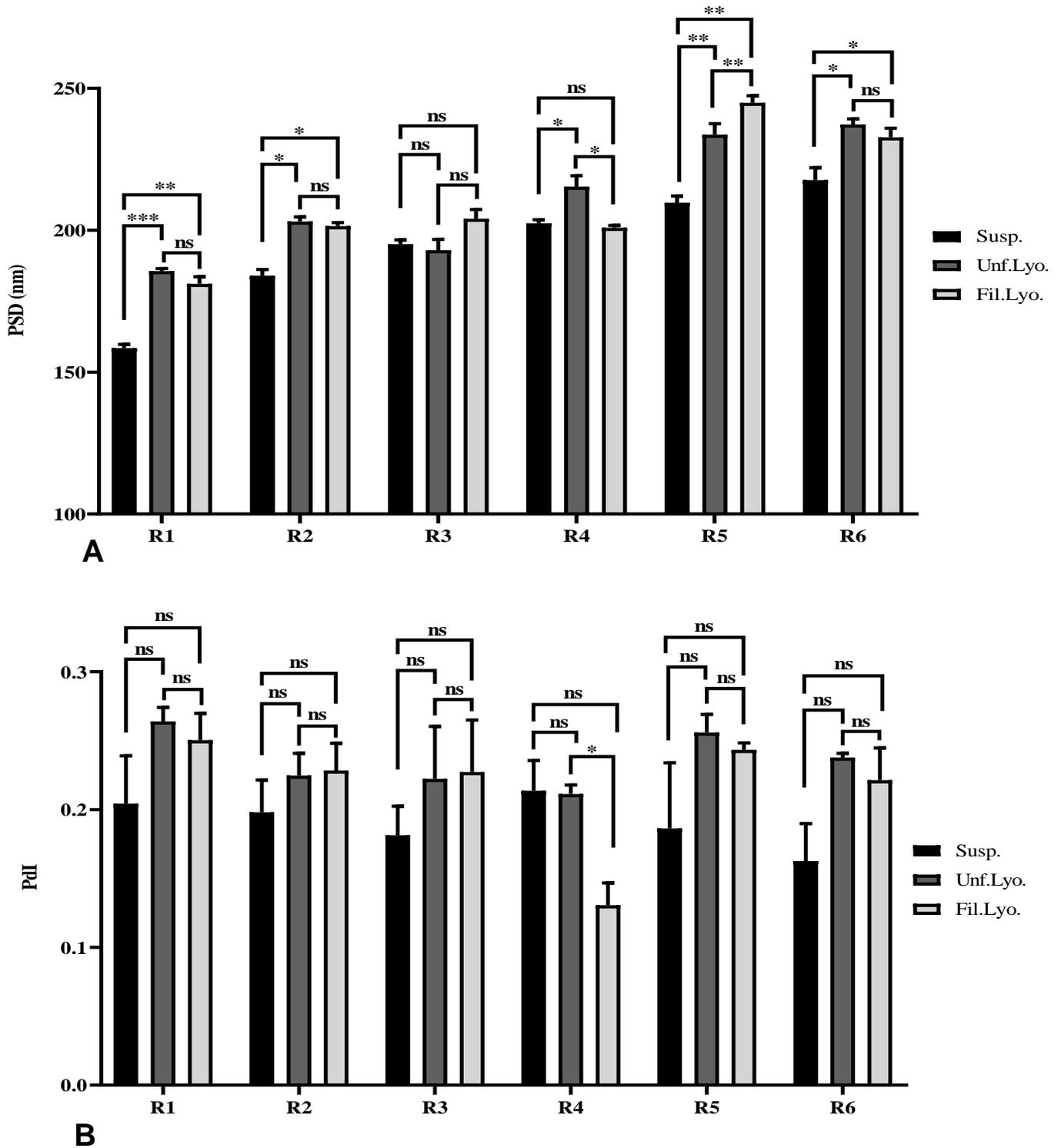


Figura 47. Análisis comparativo de la (A) distribución del tamaño de partícula (PSD) y del (B) índice de polidispersidad (PdI) de nanopartículas correspondiente a la formulación con PEG Tefose 63, empleando diferentes rampas de temperatura (R1-R6). PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.), liofilizadas sin filtrar (Unf.Lyo.) y liofilizadas filtradas (FiltLyo.). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

Por último, las rampas #3 y #4 fueron las idóneas para llevar a cabo un proceso de liofilización exitoso, siendo la diferencia en que, en la primera se añadieron condiciones de temperatura y duración del proceso en el secado secundario, mientras que en la segunda estas condiciones fueron añadidas en el secado primario. Así, se demuestra que al añadir rampas de temperatura en el secado primario en lugar del secundario, las nanopartículas en su mayoría no se agregan, pues se conoce que el secado primario es el paso más trascendental en el proceso de liofilización. De hecho, se evidenció una clara disminución del Pdl en las PEG-cSLN liofilizadas filtradas, mientras que el Pdl aumentó cuando estas condiciones fueron añadidas en el secado secundario. Por último, el potencial zeta en todas las rampas empleadas se mantuvo dentro del rango óptimo (20–45 mV) para formar complejos.

Finalmente, se logró optimizar el proceso estableciendo una apropiada y reproducible liofilización, que evite que el impacto que ejerce la misma sobre las nanopartículas no las afecte severamente. De este modo, las características fisicoquímicas de las nanopartículas se vieron lo menos comprometidas, manteniendo así, sus propiedades similares a las originales (nanopartículas suspendidas en medio acuoso sin liofilizar). En total se realizaron 25 liofilizaciones para lograr optimizar el proceso, determinando así que es necesario el estudio y la selección apropiada de los parámetros operativos antes de la liofilización de cualquier formulación, pues estos parámetros juegan un papel fundamental en la protección de las partículas contra el estrés generado por el proceso (186).

4.1.5 EFECTO DE LA CISTAMINA EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS PEG-cSLNs

Además de incorporar un nuevo excipiente PEGilado en la formulación previamente establecida a base de colestiril oleato, también se planteó la incorporación cistamina. Este excipiente interactúa con el grupo carboxilo del ácido esteárico a través de un puente salino, gracias a sus dos grupos amino terminales, influyendo en las propiedades fisicoquímicas de las partículas. Así, la cistamina fue incorporada con el propósito de reducir el tamaño de partícula, para asegurar que las PEG-SLNs puedan entrar en las células, pues se ha reportado que cuanto más pequeña es la nanopartícula, más fácil podrán ingresar (187). En consecuencia, con las mejoras previamente descritas en el proceso de fabricación, que incluyeron el aumento del tiempo y la velocidad de agitación, (82), así como los estudios de liofilización, se consideró en última instancia la

incorporación de cistamina (188) en la formulación para lograr una reducción adicional en el tamaño de partícula de las formulaciones de nanopartículas PEGiladas.

Para llevar a cabo este objetivo, se realizaron ensayos factoriales para determinar la cantidad apropiada de cistamina a incorporar, así como también, pruebas de solubilidad, sonicación y temperatura para evaluar la incorporación de cistamina y poder obtener un adecuado tamaño de partícula. Para la incorporación de cistamina se utilizaron SLNs con el PEG Myrj 52. Como resultado, se logró obtener PEG-cSLNs con propiedades fisicoquímicas adecuadas, en concreto, se consiguió reducir significativamente el tamaño de partícula incorporando 150 mg de cistamina a la formulación, estableciendo las siguientes cantidades: 98 mg de ácido esteárico, 147 mg de colesteril oleato, 105 mg de PEG, 600 mg de octadecilamina y 100 mg de poloxamer 188 (Anexo III, Tabla S2).

Asimismo, se estableció el mejor procedimiento para incorporar cistamina en la formulación, siendo el tratamiento CysSA+ETOH el más adecuado, en el cual, la cistamina se disuelve junto con el ácido esteárico en etanol (Tabla 13). Cabe recalcar, que las PEG-cSLNs más pequeñas fueron las que se obtuvieron sin colocar colesteril oleato (~100 nm), corroborando que, al añadir excipientes, el tamaño de partícula tiende a aumentar. Por último, tanto los Pdl's como los potenciales zeta se mantuvieron dentro de los valores óptimos para garantizar adecuadas características fisicoquímicas.

Tabla 13. Comparación de las características fisicoquímicas de nanopartículas correspondientes a la formulación con PEG Myrj 52 sometidas a diferentes ensayos que involucran la incorporación de cistamina.

Tratamientos ^a	Etanol (ETOH)	Cantidad (mg)	PSD (nm)	Pdl	ZP (mV)
Cys+ETOH	Si	75	184.2	0.250	32.7
		150	129.8	0.203	26.7
CysPEGSACO+ETOH	Si	75	125.1	0.192	27.2
		150	129.8	0.196	24.8
CysPEGSACO	No	75	131.2	0.186	28.7
		150	127.4	0.187	28.1
CysSA+ETOH	Si	75	136.4	0.232	32.3
		100	141.4	0.207	29.8
		150	124.2	0.186	24.7
CysSA +ETOH no CO	Si	150	111.5	0.090	34.1
	No		132.9	0.251	22.0

^a Diferentes tratamientos empleados para incorporar cistamina en la matriz de las PEG-cSLNs: cistamina diluida en etanol (Cys+ETOH); cistamina, PEG, ácido esteárico (SA) y colesteril oleato (CO) diluidos en etanol (CysPEGSACO+ETOH); cistamina, PEG, ácido esteárico (SA) y colesteril oleato (CO) sin diluir en etanol (CysPEGSACO); cistamina y ácido esteárico (SA) diluidos en etanol (CysSA+ETOH); cistamina y ácido esteárico (SA) diluidos en etanol, pero sin la incorporación de CO en la formulación (CysSA +ETOH no CO).

Con las condiciones establecidas, se procedió a realizar diversos ensayos que involucraron modificaciones en el protocolo de fabricación. De esta manera, el uso de un sonicador no presentó ventaja con relación al tamaño de partícula en comparación con el protocolo de manufactura y las condiciones previamente establecidas (Tabla 14). De igual forma, se probaron diferentes estrategias para reducir, todavía más, el tamaño de partícula, por lo que se evaluó si el tamaño se reduce al mezclar, por goteo la emulsión caliente con el agua fría.

Además, se determinó si la formación de cristales, es decir, cuando el ácido esteárico y la cistamina empiezan a solidificarse a causa de la evaporación del etanol, también podría ayudar a reducir el tamaño. Los resultados indican que tanto la sonicación, como el goteo y los cristales, no ayudaron a mejorar el tamaño de partícula (Tabla 14), por lo que se optó por continuar con el procedimiento descrito en la sección 3.2.1.6.1, bajo las condiciones previamente establecidas. De igual forma, tanto los Pdl y los ZPs se mantuvieron dentro de los valores óptimos para garantizar unas apropiadas características fisicoquímicas.

Tabla 14. Comparación de las características fisicoquímicas de nanopartículas correspondientes a la formulación con PEG Myrj 52 sometidas a diferentes ensayos que involucran la incorporación de cistamina.

Tratamientos ^a	Turrax	Cistamina (cys)	PSD (nm)	Pdl	ZP (mV)
Sonicador	Si	Si	147.3	0.180	26.0
	No	Si	163.6	0.204	26.7
Cristales	Si	No	158.5	0.149	28.6
	Si	Si	145.2	0.184	30.5
Goteo	Si	Si	153.5	0.192	30.2

^a Los tratamientos probados corresponden a la evaluación de la formación de cristales (Crystals) entre la cistamina y el ácido esteárico cuando el etanol se evapora, y la mezcla de la emulsión caliente por goteo con el agua fría para la solidificación de las nanopartículas. La formulación final contiene 150 mg de cistamina y se empleó el protocolo CysSA+ETOH para incorporarla.

Adicionalmente, se analizaron diferentes cantidades de cistamina para confirmar que el método más pertinente para incorporar la cistamina en las PEG-cSLNs es mediante el empleo del ultra Turrax (Tabla 15), siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2.1.1. También, se determinó que mediante una temperatura de ~80 °C, la cistamina se incorpora apropiadamente en las nanopartículas (Tabla 16). De esta manera, se ratificó que la cantidad de 150 mg de cistamina fue la más adecuada aplicando el protocolo de manufactura establecido. En consecuencia, se obtuvieron nanopartículas con tamaños entre 120–130 nm en comparación con los 180–200 nm que presentaban las

nanopartículas sin cistamina. De igual manera, tanto los Pdl's como los ZP's se mantuvieron dentro de los valores óptimos para garantizar unas adecuadas características fisicoquímicas.

Tabla 15. Comparación de las características fisicoquímicas de nanopartículas con diferentes cantidades de cistamina siguiendo el protocolo CysSA+ETOH y empleando ultra agitación con un Turrax.

Cantidad ^a (mg)	PSD (nm)	Pdl	ZP (mV)
75	139.1	0.208	25.0
100	128.5	0.198	27.7
150	126.1	0.198	29.0
200	128.7	0.176	24.2

^a La incorporación de cistamina se realizó con la formulación que contiene el PEG Myrj 52.

Tabla 16. Comparación de las características fisicoquímicas de nanopartículas con diferentes cantidades de cistamina, siguiendo el protocolo CysSA+ETOH, y empleando una temperatura de ~80 °C.

Cantidad ^a (mg)	PSD (nm)	Pdl	ZP (mV)
100	133.2	0.220	27.2
150	121.5	0.220	31.0
200	131.7	0.196	29.7

^a La incorporación de cistamina se realizó con la formulación que contiene el PEG Myrj 52.

La misma formulación y protocolo establecido se realizó con el PEG: DSPE y con los dos Tefoses 63 y 1500, al igual que con las SLNs sin PEG. En todas las formulaciones, el tamaño de partícula se redujo significativamente en comparación con las PEG-cSLNs que no tenían en sus estructuras incorporado cistamina (Figura 48A). De igual manera que con las SLNs con Myrj 52, el tamaño de partícula se encontraba entre los 120–130 nm. Inclusive las CO-cSLNs con cistamina presentaron una reducción en el tamaño de partícula (~150 nm) en comparación con las que no contenían cistamina (~200 nm).

En cuanto al Pdl, todas las poblaciones de las diferentes formulaciones analizadas con cistamina, se encontraban con valores menores a 0.2 demostrando que la población es monodispersa. Por lo tanto, no se evidenciaron diferencias significativas entre las nanopartículas con cistamina y las que no contenían cistamina, excepto en la formulación con Myrj 52, en la cual, el Pdl aumentó en las PEG-cSLNs con cistamina en comparación con las que no tenían cistamina (Figura 48B).

Por último, el potencial zeta de todas las formulaciones con cistamina se encontró entre 20–45 mV, adecuados para formar los PEG-SLN'splejos (Figura 48C). El potencial disminuyó significativamente en las formulaciones con DSPE y Tefose 1500, mientras que en las SLNs sin PEG éste aumentó. Así, se reflejó que las características fisicoquímicas de las nanopartículas que contienen PEG y cistamina son diferentes con respecto a las que no contienen ni PEG ni cistamina. Las formulaciones con Myrj 52 y Tefose 63 no presentaron diferencias significativas entre las PEG-cSLNs con y sin

cistamina, siendo las nanopartículas con Tefose 63 la que mantuvieron y alcanzaron el más alto potencial.

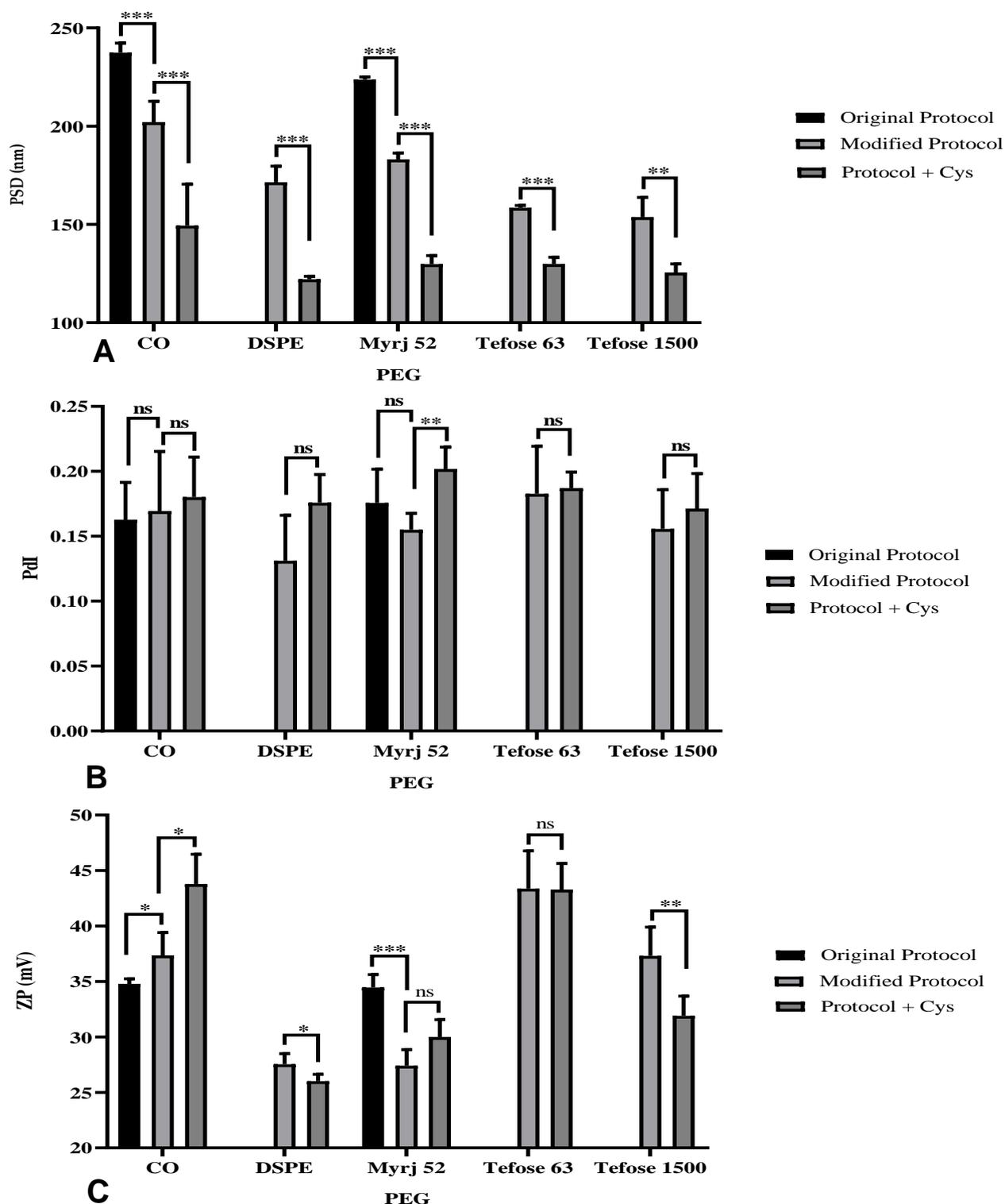


Figura 48. Análisis comparativo de la (A) distribución del tamaño de partícula (PSD), del (B) índice de polidispersidad (Pdl) y del (C) potencial zeta (Z) de nanopartículas correspondientes a cuatro formulaciones con PEGs distintos, (DSPE, Myrj 52, Tefose 63 y 1500), empleando diferentes protocolos de manufactura. CO representa colesterol oleato correspondiente a la formulación sin PEG. El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

La incorporación de 150 mg de cistamina, determinada como la cantidad óptima, en las formulaciones base (CO), PEGilada y sin PEGilar, resultó ser efectiva para reducir significativamente el tamaño de partícula. En todas las formulaciones con cistamina, se observó una disminución de ~50 nm en el tamaño de partícula en comparación con los tamaños obtenidos con el protocolo modificado, manteniendo los valores de Pdl y ZP dentro de los rangos óptimos para garantizar una distribución monodispersa, con carga superficial positiva y propiedades de estabilidad adecuadas. Este efecto se debe a la capacidad de la cistamina, un disulfuro de diaminodietilo, para interactuar con los grupos carboxilo del ácido esteárico a través de una interacción electrostática mediada por puentes salinos. La incorporación de la cistamina en la matriz de las PEG-cSLNs se facilita debido a su estructura, que incluye un doble enlace disulfuro (S-S) con dos grupos amino terminales, lo que acorta las cadenas del ácido esteárico y reduce el tamaño de la nanopartícula (188).

4.1.5.1 Liofilización de las PEG-cSLN con Cistamina

Con la cistamina incorporada, se procedió a liofilizar las nanopartículas con cuatro PEGilados diferentes (Myrj 52, Tefose 63, Tefose 1500 y DSPE) para continuar con la caracterización estructural y los ensayos biológicos. Desafortunadamente, todas las PEG-cSLNs con cistamina se vieron altamente afectadas a causa del estrés ocasionado por las condiciones impartidas del proceso de liofilización (Tabla 17), a pesar de que se determinó la temperatura de transición vítrea (Tg) (Anexo V, Figura S3) y se empleó el ciclo optimizado de liofilización descrito en la sección 4.1.4.5

Tabla 17. Comparación de las características fisicoquímicas entre nanopartículas incorporadas en su matriz cistamina después de ser liofilizadas, tanto PEGiladas como sin PEGilar.

PEG ^a	PSD (nm)	Pdl	ZP (mV)
Myrj 52	3950	0.909	43.7
DSPE	344.5	0.308	9.19
Tefose 63	830.9	0.982	47.8
*Tefose 63	226.3	0.270	28.2
Tefose 1500	1183	0.969	42.1
CO	211.8	0.223	38.4
CO+Cys	595.9	0.830	59.5

^a La formulación con PEG Tefose 63(*) con cistamina fue liofilizada con los parámetros del proceso estudiados y optimizados. El resto de las formulaciones, incluyendo las que no contienen PEG, se liofilizaron mediante un ciclo convencional.

De hecho, se puede evidenciar que la receta optimizada afectó de manera menos significativa al PEG Tefose 63 en comparación con las características fisicoquímicas resultantes del ciclo convencional sin optimizar detallado en la sección 3.2.1.2.

En conclusión, estos resultados refuerzan que, al añadir un nuevo excipiente a cualquier formulación galénica, se debe estudiar nuevamente el proceso de fabricación, revelando la importancia de la aplicación de la ICHQ8 en cualquier formulación farmacéutica que se desarrolle, incluido en las formulaciones con nanopartículas.

4.1.6 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS PEG-cSLNs

El estudio de la estabilidad de las PEG-cSLNs es fundamental para garantizar su viabilidad y eficacia en aplicaciones farmacéuticas. El parámetro Pdl es relevante, ya que indica si las partículas están empezando a agregarse, siendo un excelente indicador de la estabilidad de las nanopartículas. Este análisis se divide en tres subapartados que abordan diversos aspectos de la estabilidad de las PEG-cSLNs en diferentes condiciones y formulaciones. En el primer subapartado, se evalúa la estabilidad a corto plazo de las PEG-cSLNs suspendidas sin proceso de liofilización, proporcionando información sobre su comportamiento inicial en almacenamiento.

Por otro lado, el segundo subapartado se enfoca en investigar la estabilidad a largo plazo de las PEG-cSLNs después del proceso de liofilización, analizando su capacidad para mantener la integridad estructural y las propiedades fisicoquímicas durante un período prolongado. Por último, en el tercer subapartado se analiza la estabilidad de las PEG-cSLNs con cistamina, examinando cómo influye en su estabilidad la combinación de estos dos excipientes. Este estudio integral de estabilidad permite abordar exhaustivamente distintos aspectos de las SLNs, desde su forma líquida hasta su versión liofilizada, proporcionando una visión completa de su comportamiento en distintas condiciones.

4.1.6.1 Estudio de Estabilidad de las PEG-cSLNs Suspendidas sin Liofilizar

Los estudios de estabilidad se llevaron a cabo durante 30 días con dos diferentes temperaturas, 4 °C y 25 °C, para determinar la estabilidad temporal de las PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar, con el objetivo de tener unos primeros datos sobre el posible *holding time* que podrían tener estas formulaciones antes del proceso de liofilización. Los puntos de análisis fueron a los 6, 10, 15, 20, 24, 29, y 34 días. En todas las formulaciones, las PEG-cSLNs presentaron una mejor estabilidad a 4 °C que a 25 °C puesto que la población de nanopartículas permaneció monodispersa ($Pdl < 0.2$) durante los 30 días transcurridos (Figura 49). Sin embargo, los valores del Pdl de todas las formulaciones a 25 °C, incluyendo una (Brij S100) a 4 °C presentaron correlación con el tiempo transcurrido (Anexo III, Tabla S6). En consecuencia, los Pdl aumentaron

a lo largo del tiempo, en donde, aproximadamente en el día 20 los índices fueron superiores a 0.2.

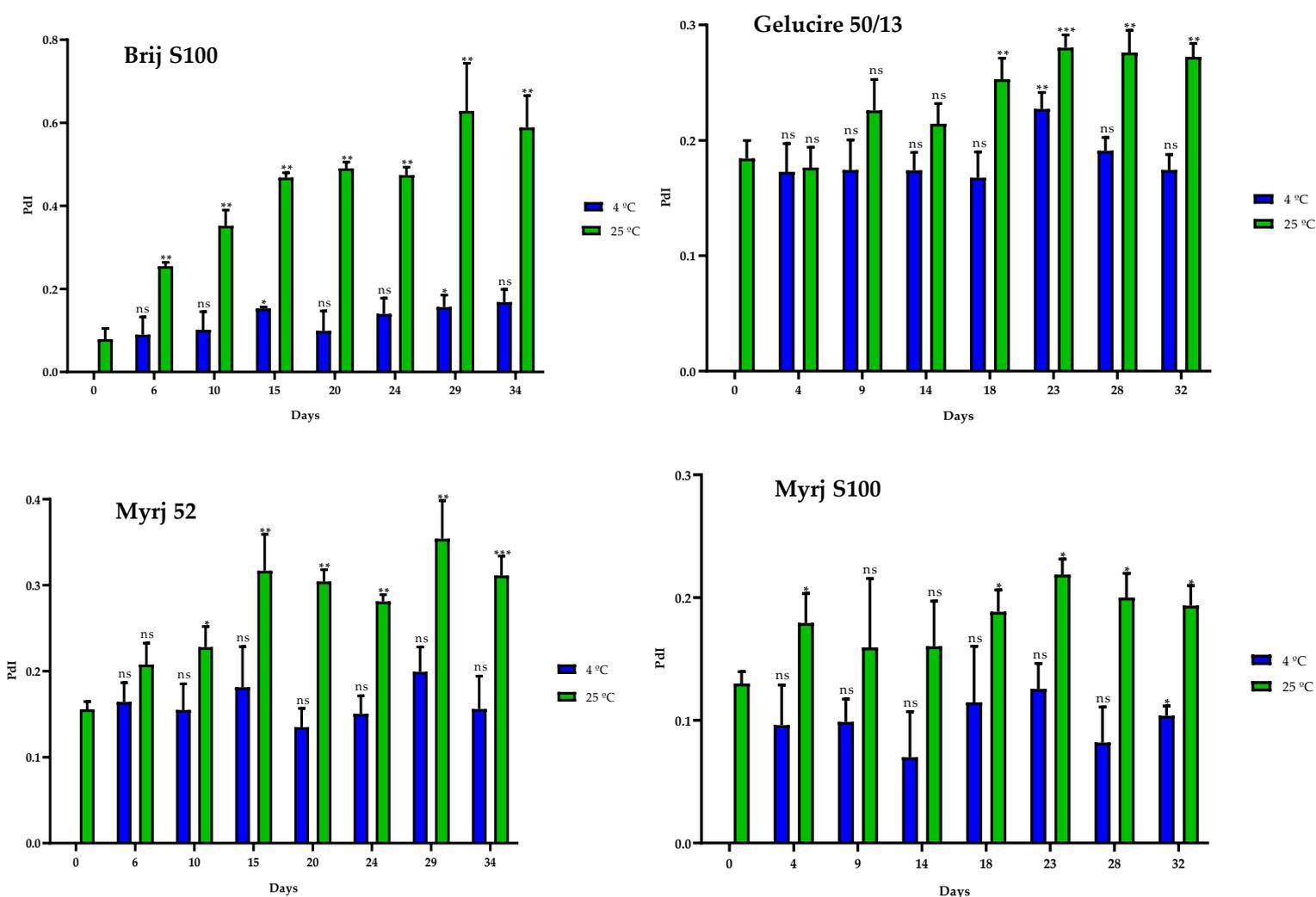


Figura 49. Índice de polidispersidad (Pdl) de nanopartículas correspondientes a cuatro formulaciones con PEGs distintos (Brij S100, Gelucire, Myrj 52 y Myrj S100) durante un período de 30 días a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

De igual manera, los tamaños de partícula en todas las formulaciones fueron de menor tamaño a 4 °C que a 25 °C. No obstante, se puede apreciar que existe un incremento en el tamaño en comparación con el día inicial de manufactura (Figura 50). En consecuencia, claramente se puede apreciar una correlación entre los días transcurridos y los tamaños de partícula de todas las formulaciones con las dos temperaturas utilizadas. En otras palabras, a medida que pasan los días, el tamaño de las PEG-cSLNs aumenta progresivamente (Anexo III, Tabla S6).

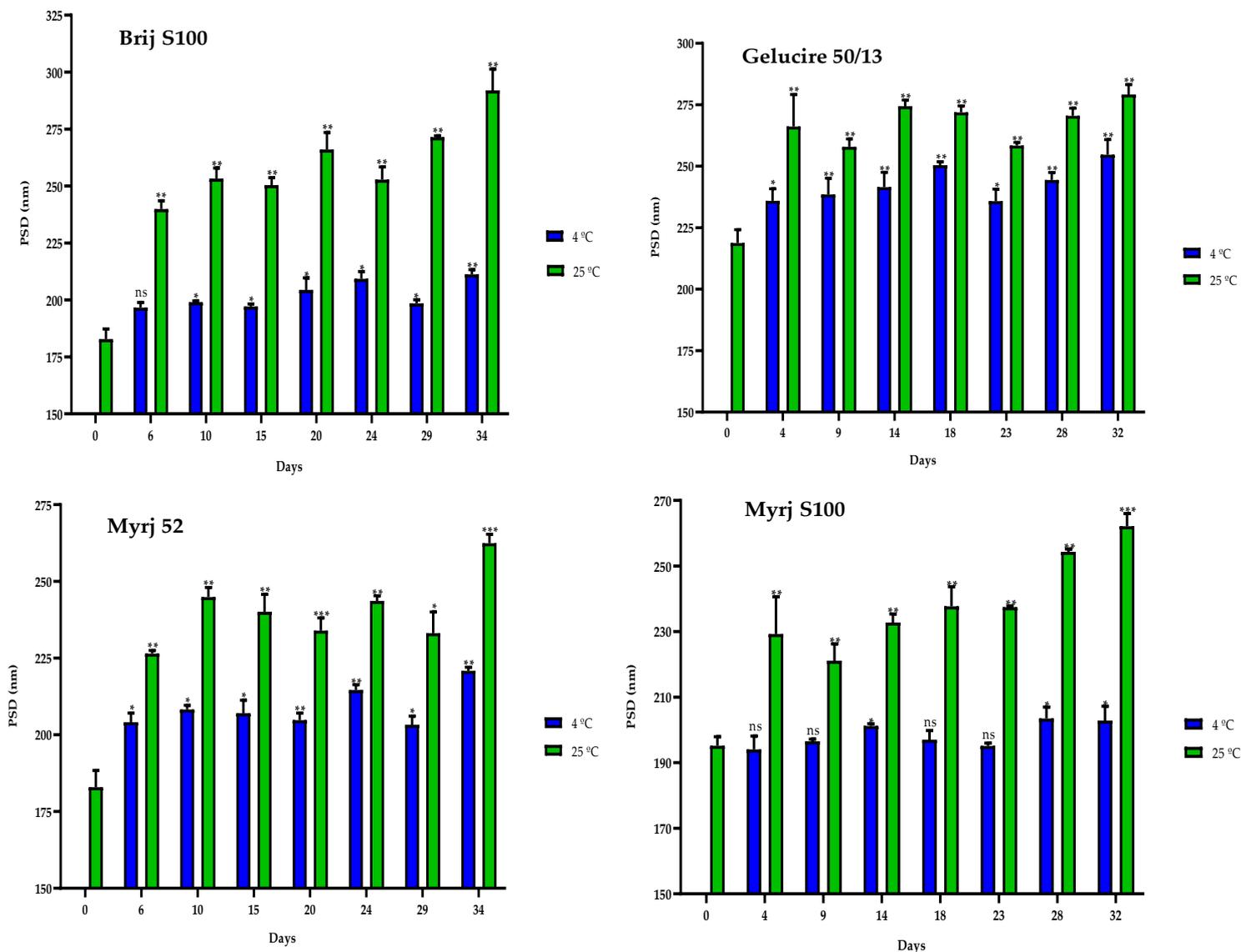


Figura 50. Distribución del tamaño de partícula (PSD) de nanopartículas correspondientes a cuatro formulaciones con PEGs distintos (Brij S100, Gelucire, Myrj 52 y Myrj S100) durante un período de 30 días a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

Por último, los valores del potencial zeta de las PEG-cSLNs se mantuvieron dentro del rango requerido, entre 20–45 mV durante el período de almacenamiento de 30 días (Figura 51). Adicionalmente, se determinaron correlaciones entre el potencial Z y los días transcurridos de todas las formulaciones a 4 °C, excepto para la formulación de Brij S100 (Anexo III, Tabla S6). De este modo, a medida que pasaron los días, el potencial Z de las PEG-cSLNs aumentó, de los cuales, aproximadamente desde el día 23 se puede observar un incremento del potencial.

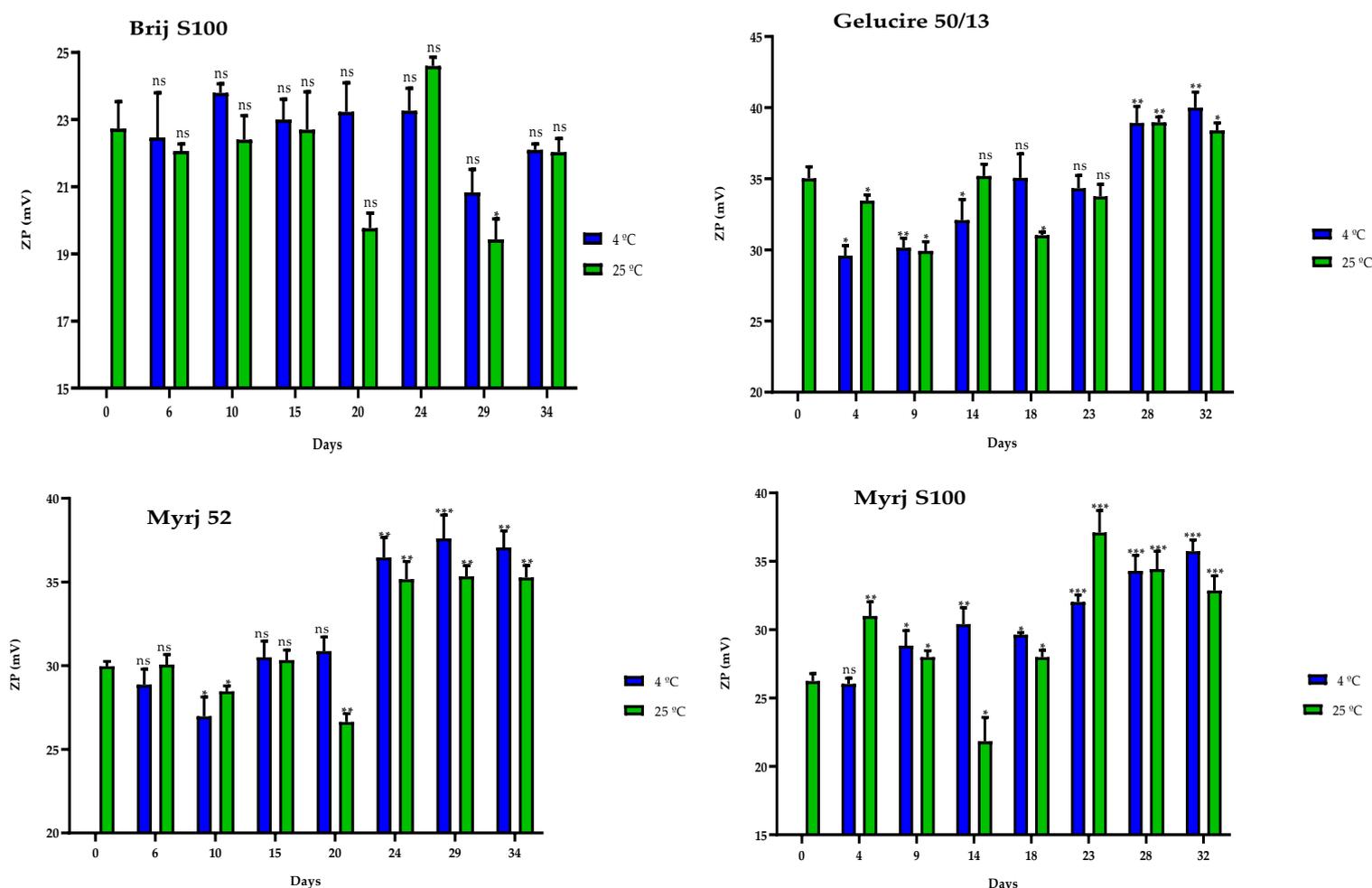


Figura 51. Potencial Zeta (ZP) de nanopartículas correspondientes a cuatro formulaciones con PEGs distintos (Brij S100, Gelucire, Myrj 52 y Myrj S100) durante un período de 30 días a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

Parámetros como el tamaño de partícula y la distribución de tamaño (Pdl) son factores importantes para evaluar la estabilidad de los sistemas coloidales suspendidos en medio acuoso sin liofilizar (189). En este contexto, Suñé-Pou *et al.* (2019) reportó que las CO-cSLNs empezaron a agregarse a partir del día 18 aproximadamente, llegando a una máxima agregación en el día 24 a 4 °C. Para un mejor rendimiento, recomendaron mantener las nanopartículas por un periodo máximo de 15 días a 4 °C. No obstante, las PEG-cSLNs fueron más estables (~30 días) en comparación con las originales, debido a factores favorables como la estabilidad estérica otorgada por el PEG y la carga superficial establecida por el lípido catiónico utilizado. Esto indica que las CO-SLNs PEGiladas se mantienen estables, con valores de Pdl inferiores a 0.2, incluso después de 30 días de almacenamiento a 4 °C, duplicando así el tiempo de estabilidad de las nanopartículas sin PEGilar.

4.1.6.2 Estudio de Estabilidad de las PEG-cSLNs Liofilizadas

Una vez conocida la estabilidad de las PEG-cSLNs antes de ser liofilizadas, se procede a realizar un estudio de estabilidad de las nanopartículas liofilizadas, con una duración de 12 meses y utilizando las mismas temperaturas de la sección anterior (4 °C y 25 °C). Los tiempos de análisis fueron a los 1, 3, 6, 9 y 12 meses. Los resultados obtenidos mostraron una estabilidad similar a la observada en las nanopartículas sin liofilizar en términos de Pdl, evidenciando que todas las formulaciones con PEG liofilizadas mantuvieron una mejor estabilidad a 4 °C que a 25 °C. En efecto, todos los valores de Pdl permanecieron alrededor de 0.2 (Figura 52), indicando que las PEG-cSLNs reconstituidas mantuvieron una dispersión poblacional monodispersa durante un año, con la excepción de la formulación con Brij S100, que fue el PEG más afectado por el tiempo transcurrido.

Además, se determinó una correlación entre el Pdl y el tiempo transcurrido para las formulaciones con Gelucire y Myrj 52 a 4 °C (Anexo III, Tabla S7). Sin embargo, no se encontraron ninguna correlación con el resto de las formulaciones (Brij S100, DSPE, and Myrj S100). Este factor puede ser atribuido a las largas cadenas de carbono presentes en estos PEGs, particularmente el DSPE, el cual conduce a una mayor fuerza de repulsión a causa del efecto estérico que ejerce sobre los cSLN que se encuentran completamente recubiertas (136,190).

En relación con el PSD, al igual que los resultados obtenidos de la estabilidad de las nanopartículas sin liofilizar, las PEG-cSLNs liofilizadas presentaron tamaños estables a 4 °C en todas las formulaciones, incluyendo la que tiene Brij S100 (Figura 53). Curiosamente, en algunas formulaciones, las SLNs fueron más pequeñas a 25 °C que a 4 °C, y viceversa (DSPE, Gelucire, Myrj 52 y S100), lo que indica la inestabilidad que presentan las nanopartículas a temperatura ambiente. Esto sugiere que la temperatura más efectiva para mantener y evitar la aglomeración de las PEG-cSLNs es a 4°C. Además, no se encontró ninguna correlación entre el tamaño de partícula y el tiempo transcurrido con las dos temperaturas analizadas, excepto en la formulación con Brij S100 a 4 °C (Anexo III, Tabla S7). Esto significa que el tamaño de partícula se mantuvo estable durante todo el año completo.

En cuanto al ZP, en algunas formulaciones las PEG-cSLNs presentaron una mayor carga superficial a 25 °C que a 4 °C (DSPE, Gelucire, Myrj 52 and S100; Figura 54). No obstante, todos los valores del potencial Z se mantuvieron dentro del rango requerido (20–45 mV) durante todo el año transcurrido en todas las formulaciones, como se

confirmó con los posteriores ensayos biológicos que evaluaron la unión electrostática del material genético con las nanopartículas.

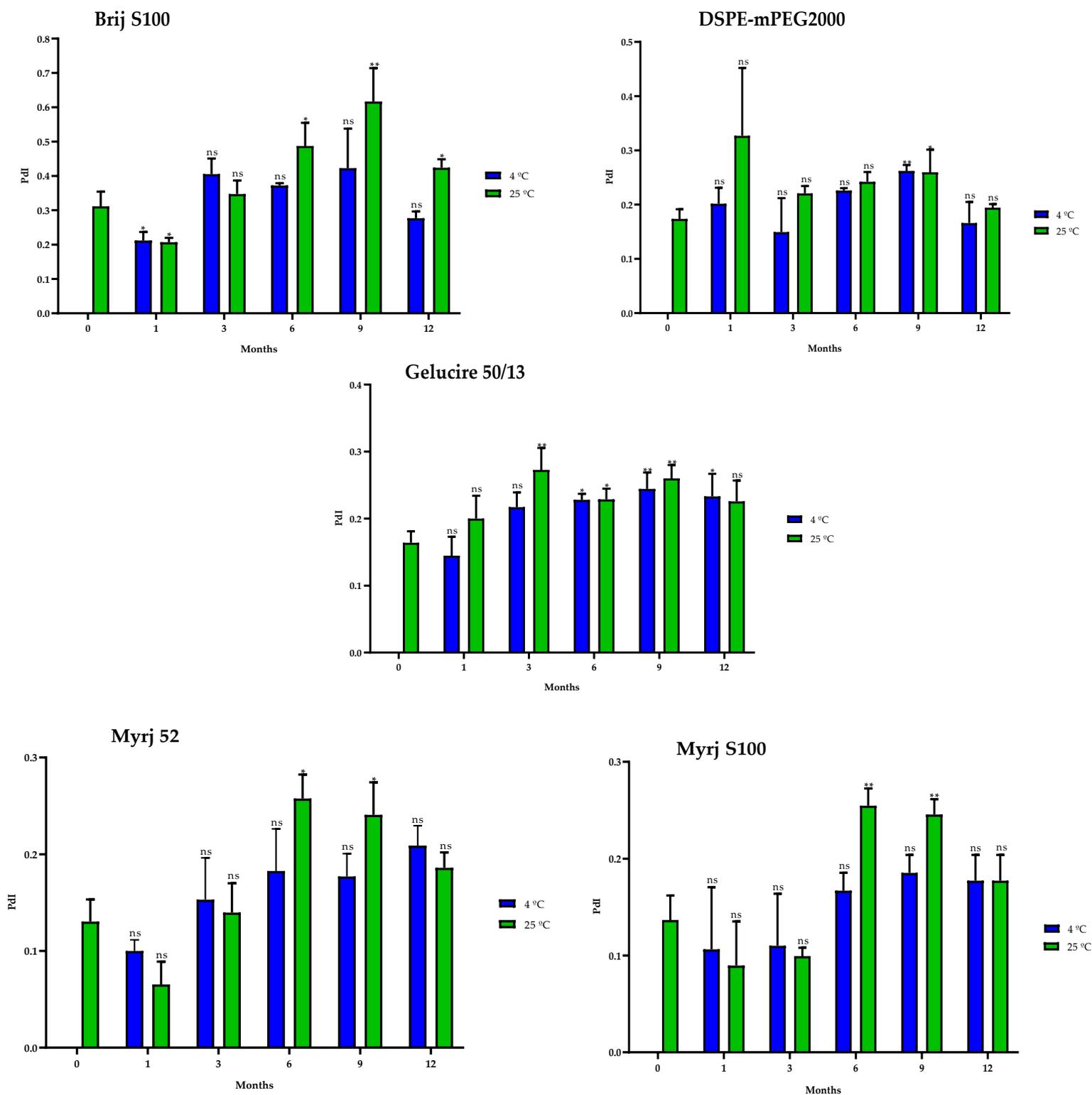


Figura 52. Índice de polidispersidad (Pdl) de nanopartículas correspondientes a cinco formulaciones con PEGs distintos (Brij S100, Gelucire, DSPE, Myrj 52 y Myrj S100) durante un año a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

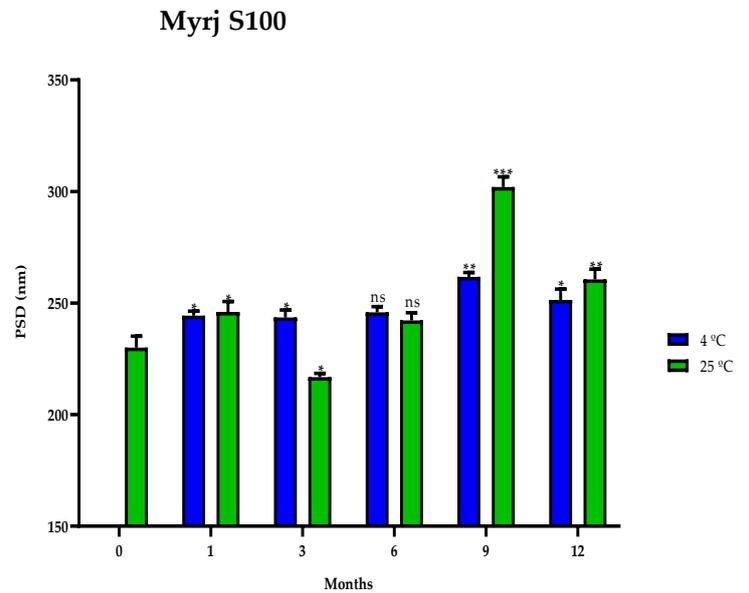
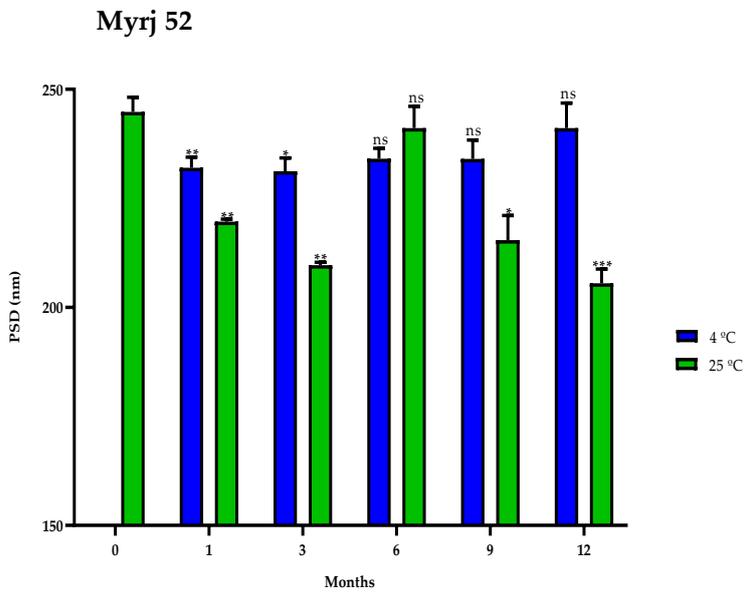
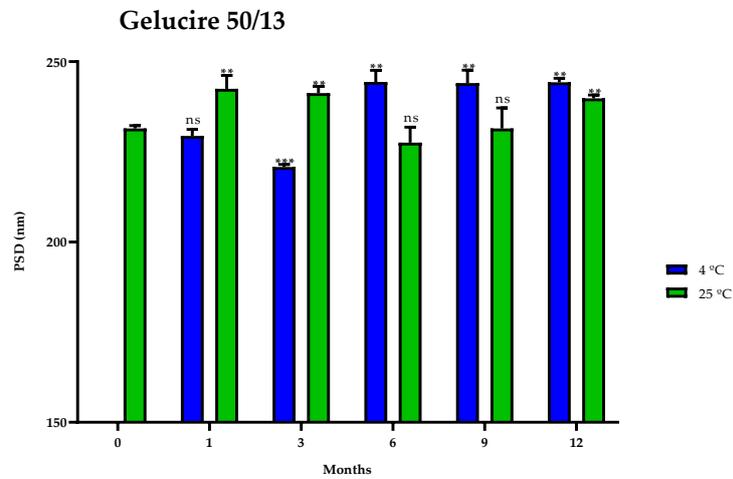
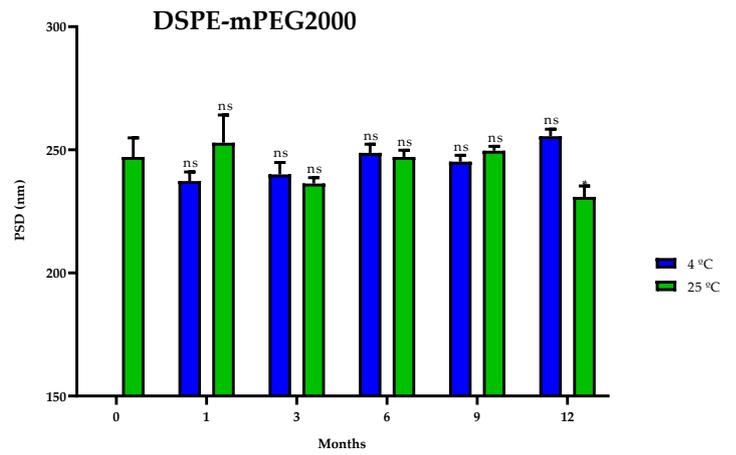
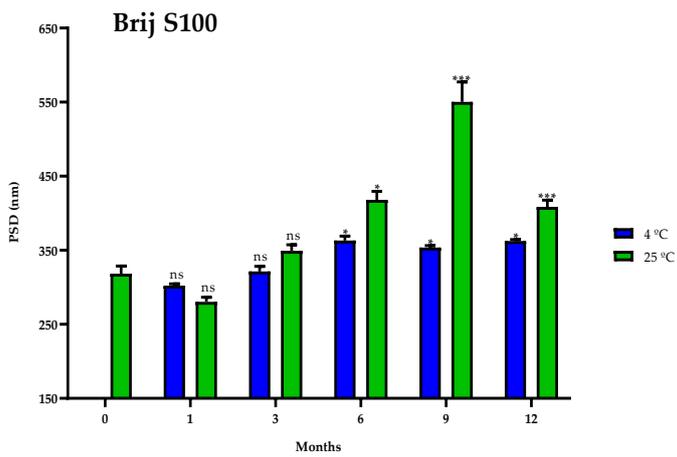


Figura 53. Distribución del tamaño de partícula (PSD) de nanopartículas correspondientes a cinco formulaciones con PEGs distintos (Brij S100, Gelucire, DSPE, Myrj 52 y Myrj S100) durante un año a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p=0.01-0.05$, ** $p=0.001-0.01$ y *** $p<0.001$.

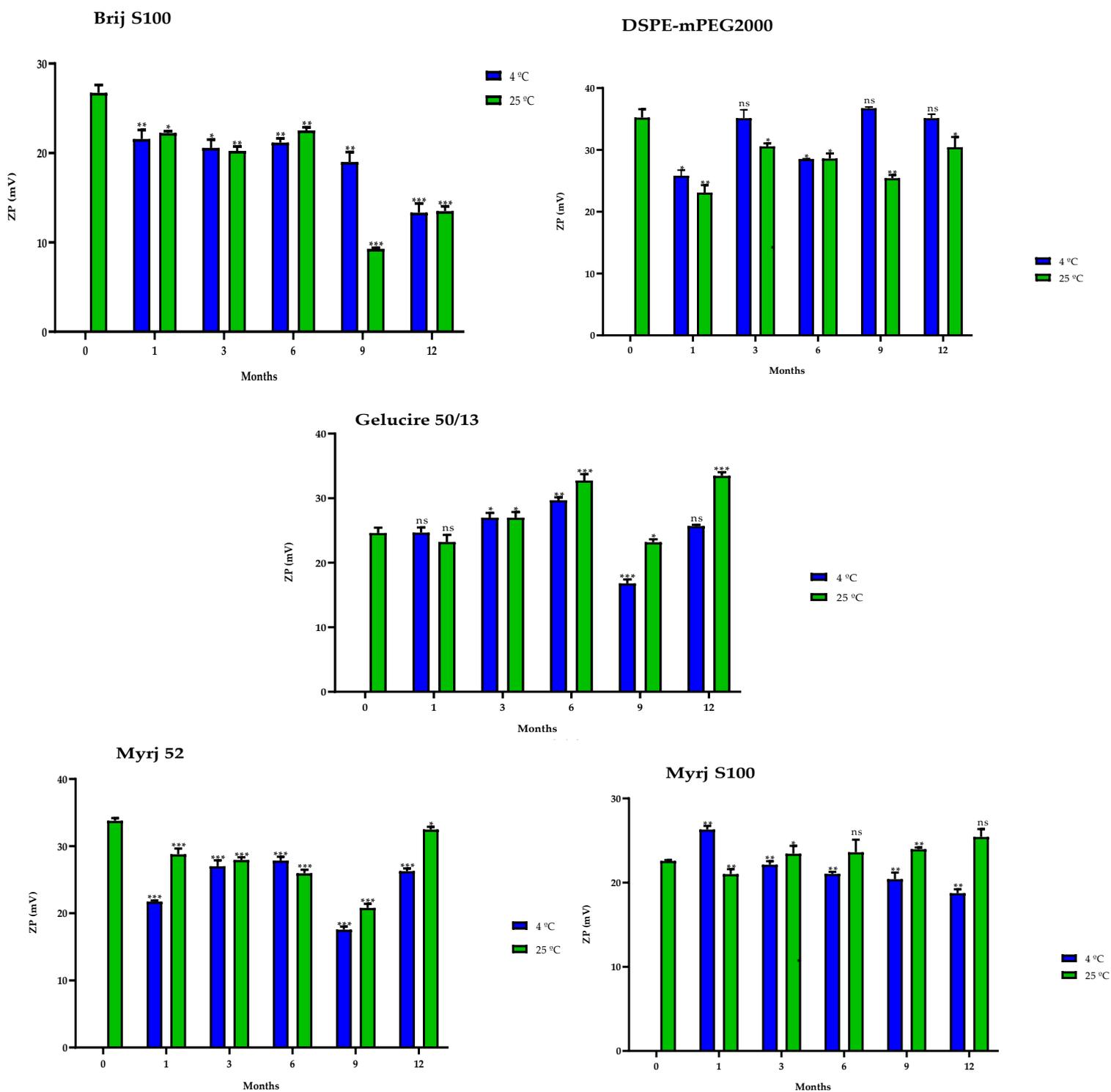


Figura 54. Potencial Zeta (ZP) de nanopartículas correspondientes a cinco formulaciones con PEGs distintos (Brij S100, Gelucire, DSPE, Myrj 52 y Myrj S100) durante un año a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C). El análisis estadístico se realizó por triplicado. No existen diferencias significativas (ns), * $p = 0.01-0.05$, ** $p = 0.001-0.01$ y *** $p < 0.001$.

En conclusión, se consiguió el propósito de preservar la estabilidad a largo plazo y extender la vida útil de las nanopartículas con un proceso de liofilización, a pesar de que más esfuerzos deben ser empleados con tal de optimizar dicho proceso. Sin embargo, a través de la mejora de los parámetros que conlleva el proceso de liofilización, es posible mantener la integridad de las características fisicoquímicas de las nanopartículas, y posteriormente potenciar su estabilidad a largo plazo en unas condiciones de almacenamiento asequibles (4 °C).

4.1.6.3 Estudio de Estabilidad de las PEG-cSLNs con Cistamina

Con la cistamina incorporada, se procedió a realizar el estudio de estabilidad con cuatro PEGilados diferentes (DSPE, Myrj 52, Tefose 63, Tefose 1500) y con las SLNs sin PEG (CO), utilizando el procedimiento detallado en la sección 3.2.1.6 De esta manera, las PEG-cSLNs con cistamina suspendidas en medio acuoso sin liofilizar permanecieron 30 días bajo dos temperaturas diferentes (4 °C y 25 °C) para determinar la estabilidad temporal de estas nanopartículas. Los puntos de análisis fueron a los 6, 10 15, 20, 25 y 31 días.

Los resultados obtenidos fueron similares a los estudios de estabilidad previamente desarrollados (Sección 4.1.6.1). Se puede observar que, en todas las formulaciones, las PEG-cSLNs con cistamina presentaron una mejor estabilidad a 4 °C que a 25 °C, puesto que la población de nanopartículas permaneció monodispersa ($PDI < 0.2$) durante los 30 días transcurridos (Figura 55). De manera similar que los PDI, en todas las formulaciones los tamaños de partícula fueron de menor tamaño a 4 °C que a 25 °C. No obstante, se puede apreciar que existe un incremento en el tamaño en comparación con el día inicial de manufactura (Figura 56). Por lo tanto, a medida que pasan los días, el tamaño de las PEG-cSLNs aumenta progresivamente, es decir, se aglomeran debido a las fuerzas irreversibles de atracción que existen entre ellas.

Por último, los valores del potencial zeta de las PEG-cSLNs con cistamina se mantuvieron dentro del rango requerido, entre 20–45 mV, durante el período de almacenamiento de 30 días, tanto a 4 °C como a 25 °C (Figura 57). En las formulaciones con DSPE y Myrj 52, a partir del día quinto, el potencial aumentó considerablemente. Quizás se puede deber a la aglomeración de las nanopartículas o a la influencia que la cistamina provoca en la matriz de las nanopartículas.

En resumen, todas las formulaciones de PEG-cSLNs con cistamina suspendidas en medio acuoso sin liofilizar presentaron mayor estabilidad a 4 °C que a 25 °C,

manteniendo una población monodispersa de nanopartículas ($PdI < 0.2$) durante un período de 30 días. Aunque se observó un aumento progresivo en el tamaño de partícula con el tiempo, indicativo de aglomeración debido a fuerzas de atracción irreversibles, los valores del ZP se mantuvieron dentro del rango requerido (20–45 mV) a lo largo del período de almacenamiento.

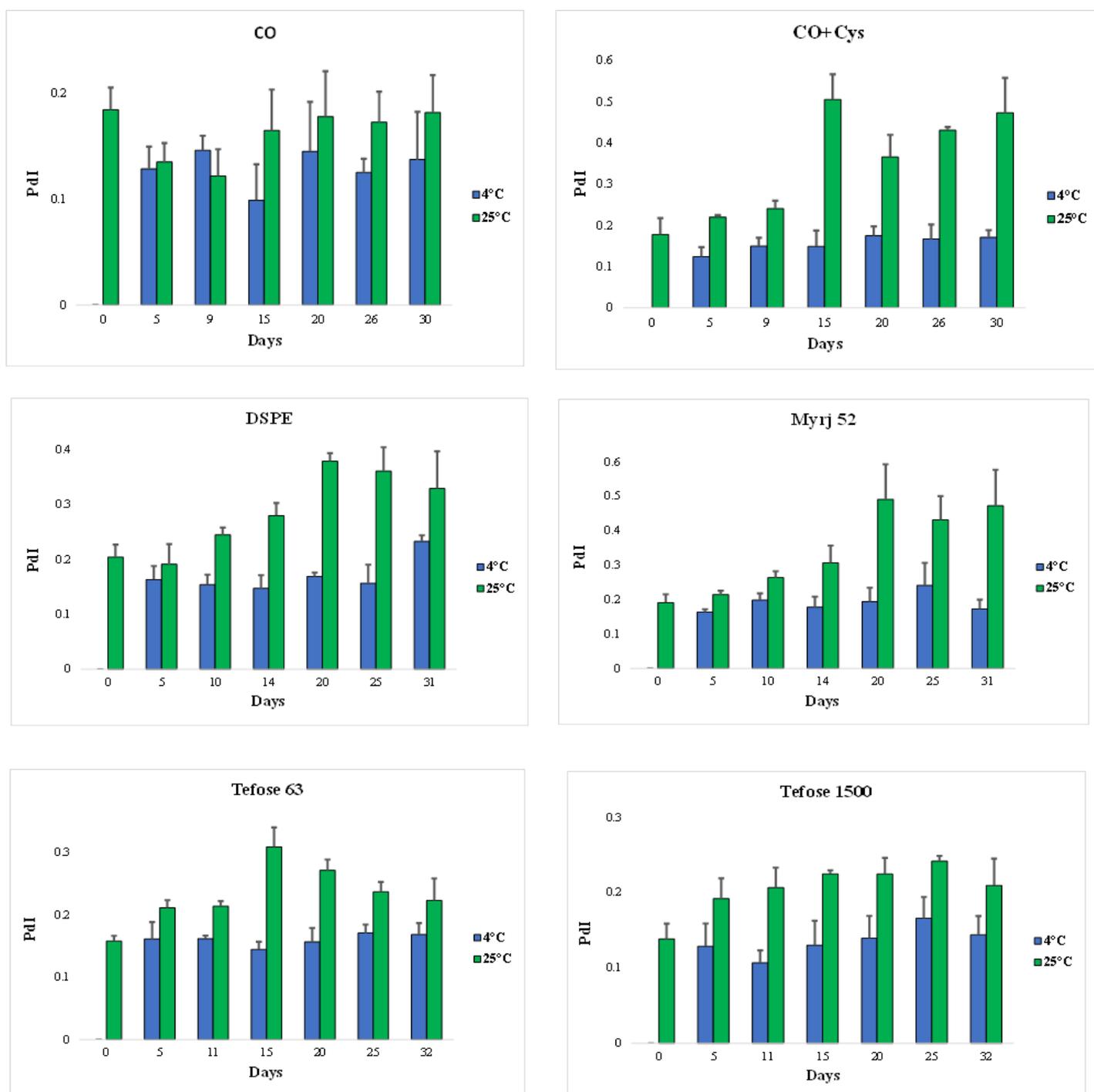


Figura 55. Índice de polidispersidad (PdI) de nanopartículas con cistamina correspondientes a cuatro formulaciones con PEGs distintos (DSPE, Myrij 52, Tefoses 63 y 1500) durante un período de 30 días a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C). CO representa colesteril oleato correspondiente a la formulación sin PEG; CO+Cys representa colesteril oleato correspondiente a la formulación sin PEG con cistamina.

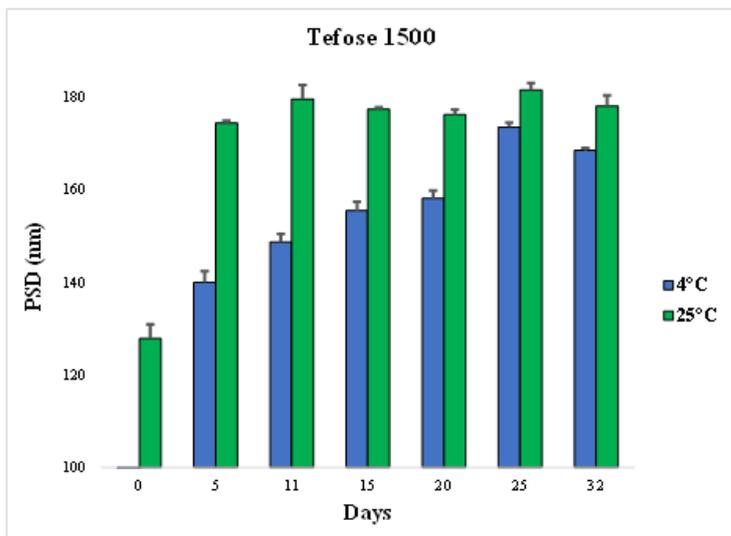
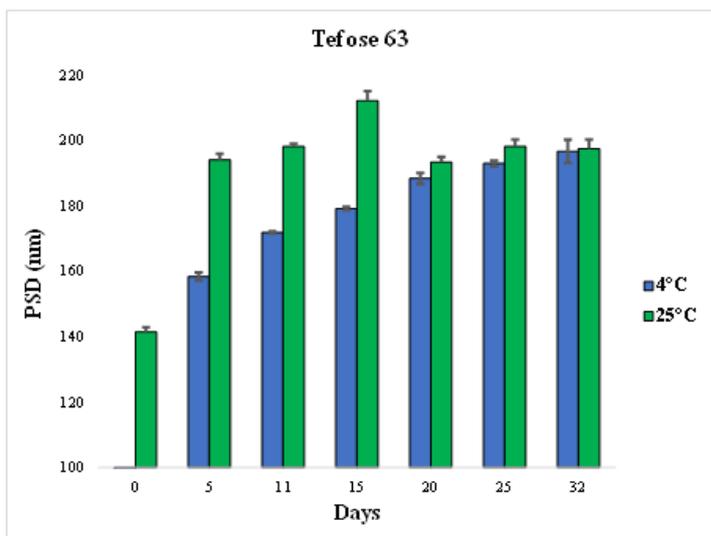
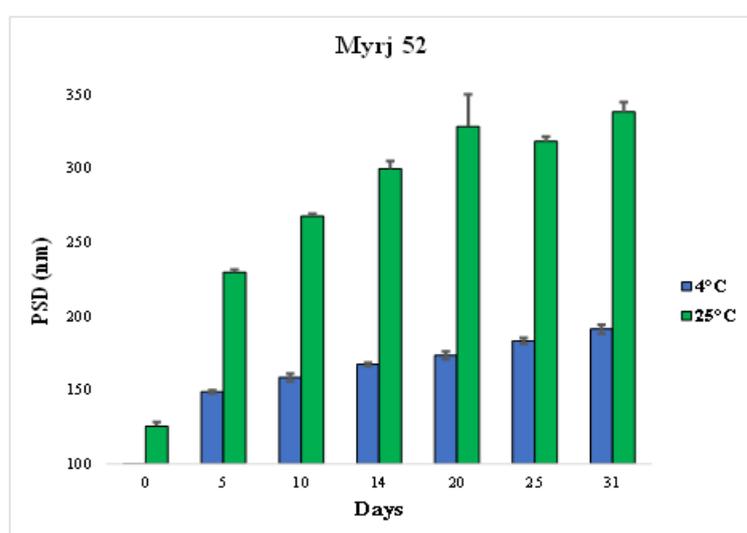
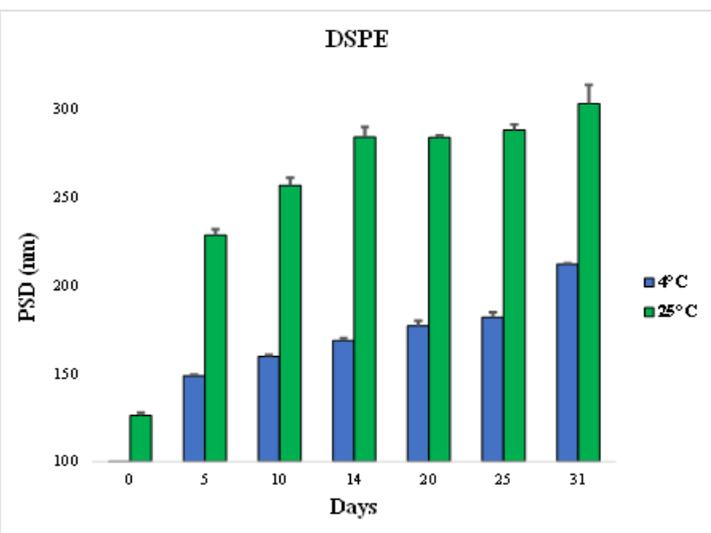
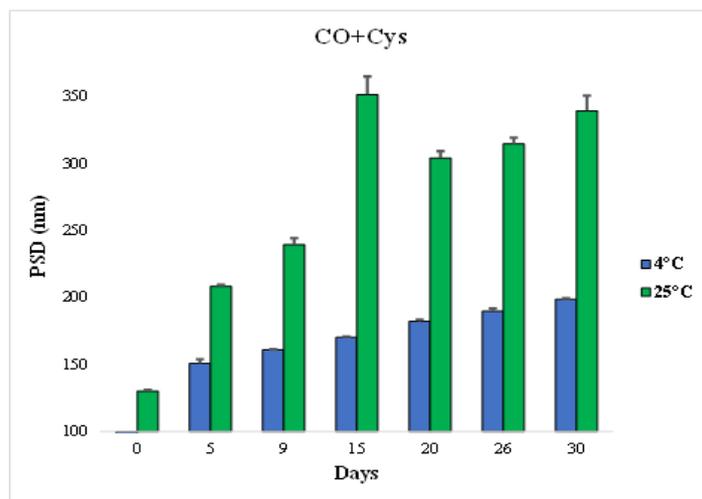
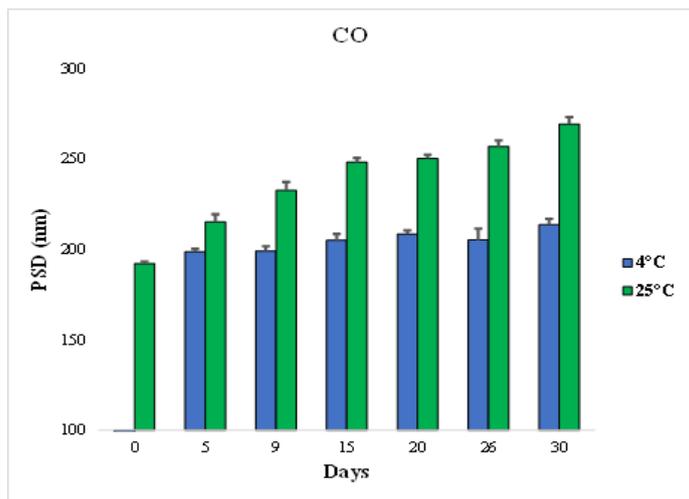


Figura 56. Distribución del tamaño de partícula (PSD) de nanopartículas con cistamina correspondientes a cuatro formulaciones con PEGs distintos (DSPE, Myrij 52, Tefoses 63 y 1500) durante un período de 30 días a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C). CO representa coleseril oleato correspondiente a la formulación sin PEG; CO+Cys representa coleseril oleato correspondiente a la formulación sin PEG con cistamina.

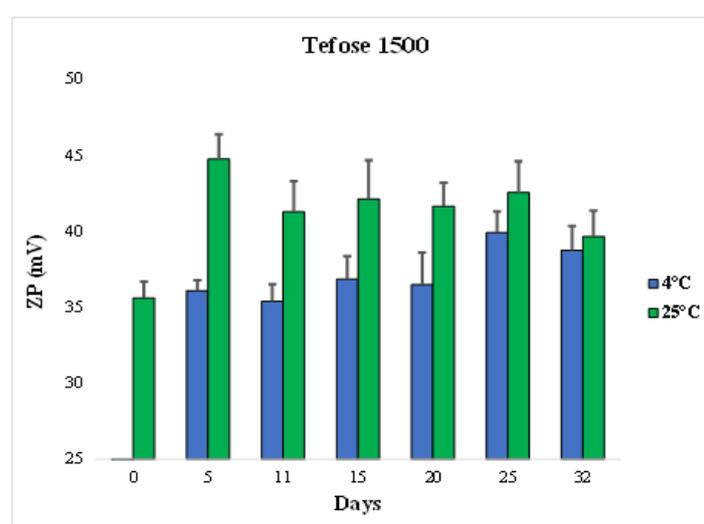
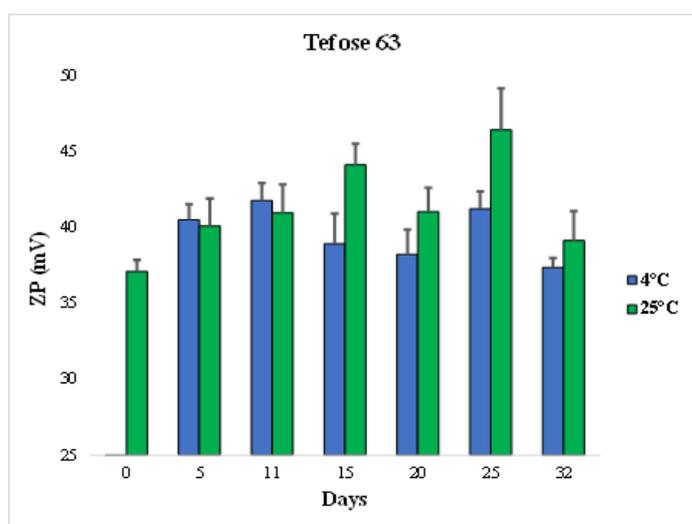
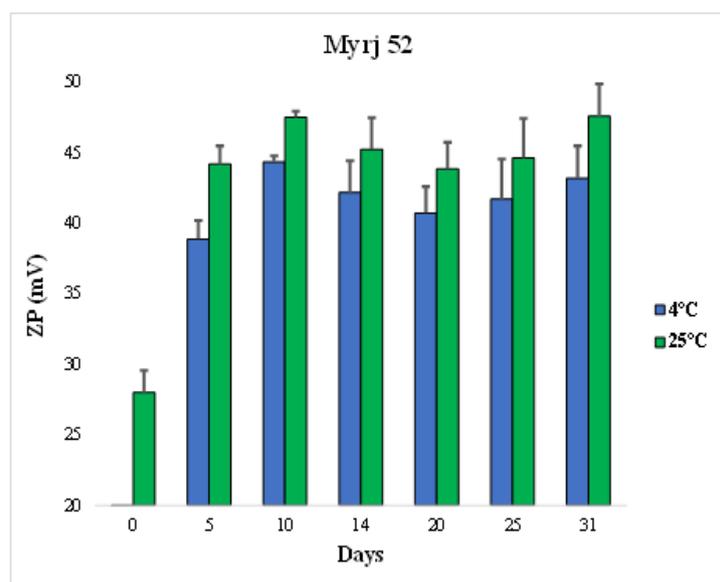
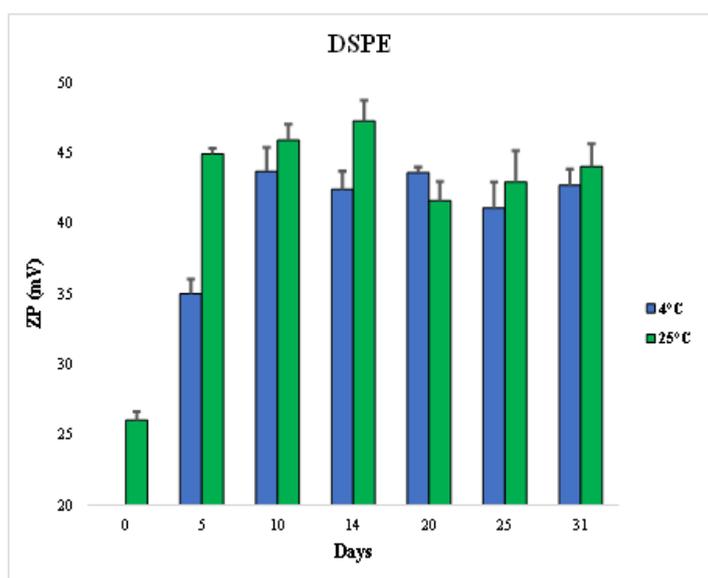
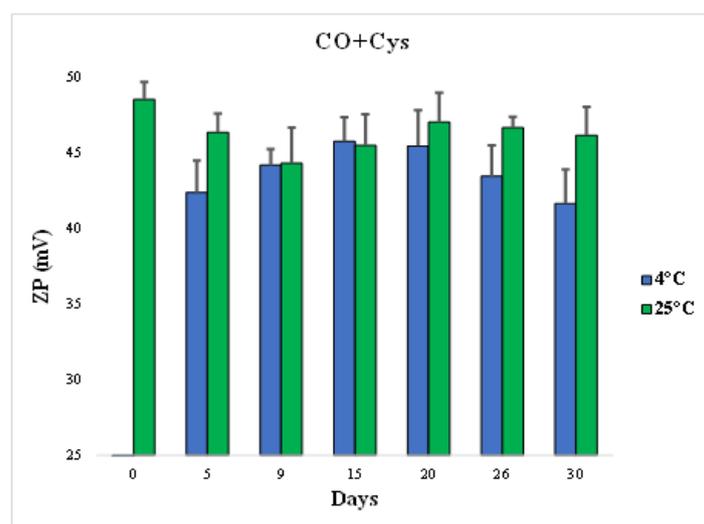
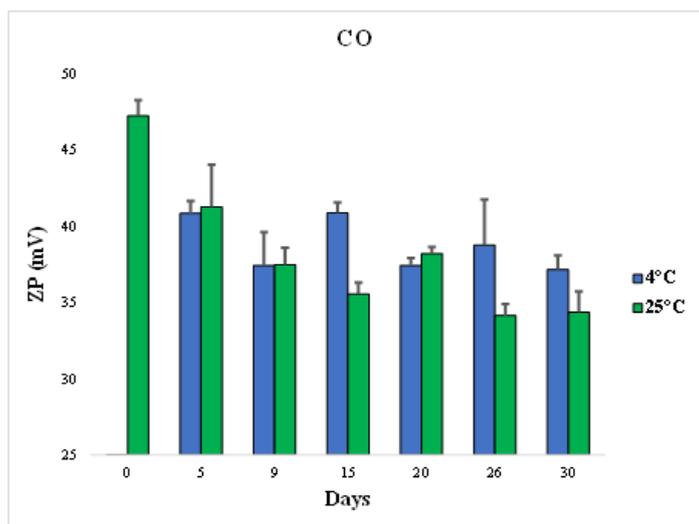


Figura 57. Potencial Zeta (ZP) de nanopartículas con cistamina correspondientes a cuatro formulaciones con PEGs distintos (DSPE, Myrij 52, Tefoses 63 y 1500) durante un período de 30 días a diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C). CO representa colesterol oleato correspondiente a la formulación sin PEG; CO+Cys representa colesterol oleato correspondiente a la formulación sin PEG con cistamina.

4.2 SECCIÓN BIOLÓGICA

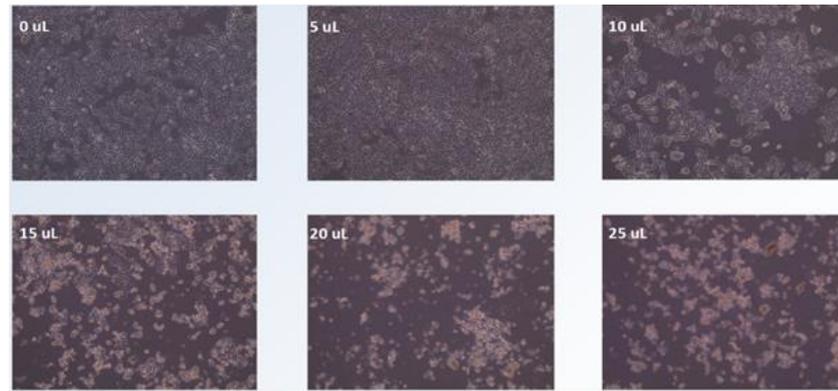
4.2.1 CITOTOXICIDAD DE LAS PEG-cSLNs

Se determinaron los efectos sobre la viabilidad/citotoxicidad celular de cinco formulaciones con PEGs distintos incorporados en el núcleo de la matriz de las cSLNs, antes y después del proceso de liofilización. Se incubaron diferentes volúmenes de cada PEG-cSLN con células HEK293T durante 24 y 48 h. Como resultado, en todas las formulaciones que contienen PEG, se observaron efectos tóxicos a nivel visual utilizando volúmenes superiores a 15–20 μL , tanto en las nanopartículas suspendidas sin liofilizar como en las reconstituidas (Figura 59). Adicionalmente, todas las formulaciones liofilizadas, incluyendo la que no contiene PEG (CO-cSLNs), presentaron menor toxicidad que las nanopartículas suspendidas en medio acuoso sin liofilizar, ratificando la ventaja de utilizar la liofilización como proceso para mantener las nanopartículas estables a lo largo del tiempo.

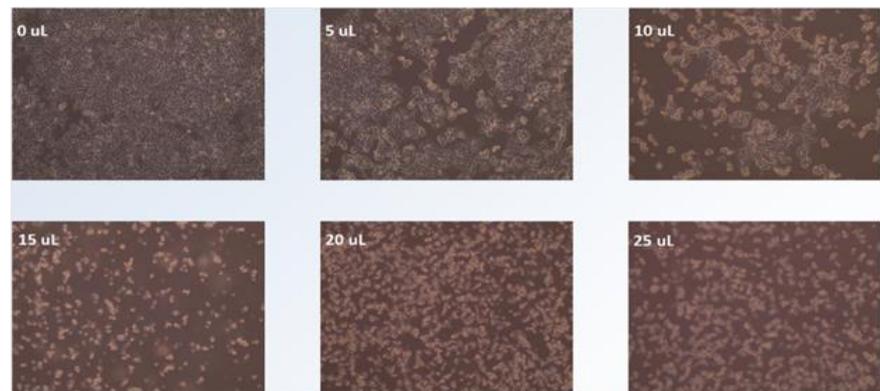
En todas las formulaciones liofilizadas, volúmenes entre 5–10 μL son favorables para no provocar muerte celular. Solamente la formulación con PEG DSPE, empleando un volumen de 10 μL , no presentó toxicidad en los dos estados analizados (PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar y liofilizadas), el resto de las formulaciones con nanopartículas suspendidas sin liofilizar presentaron toxicidad a partir de este volumen. Las formulaciones DSPE, Gelucire y Mirj S100 mostraron ser posibles candidatos para transfectar células empleando 10 μL de solución, mientras que Brij S100 y Myrj 52, con el mismo volumen resultaron ser tóxicas.

Estos resultados cualitativos fueron corroborados cuantitativamente por citometría (Figura 58), reflejando que, al agregar un volumen de 20 μL o más de PEG-SLNs, la viabilidad celular disminuye aproximadamente un 65% en comparación con las células no tratadas después del tiempo de incubación. También, estos resultados revelaron que efectivamente a volúmenes de 10 μL , en todas las formulaciones y, al parecer, en ambos estados (PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar y liofilizadas), las PEG-cSLNs demostraron presentar una alta viabilidad celular, con resultados superiores al 90%. Así, se evidencia la ausencia de toxicidad de 10 μL de todas las formulaciones de nanopartículas en las células HEK293T.

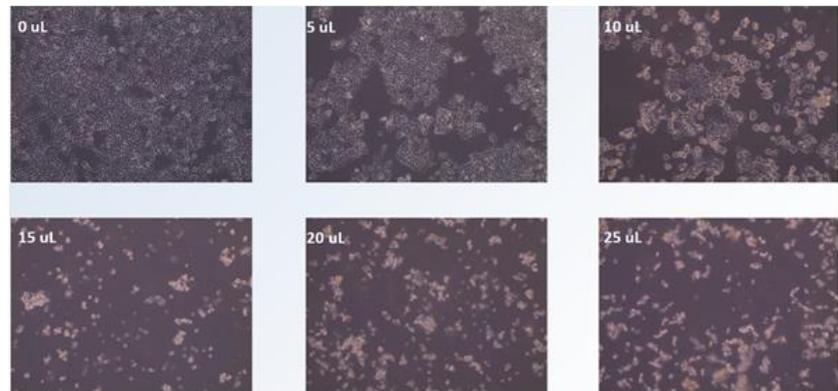
Susp. 24h



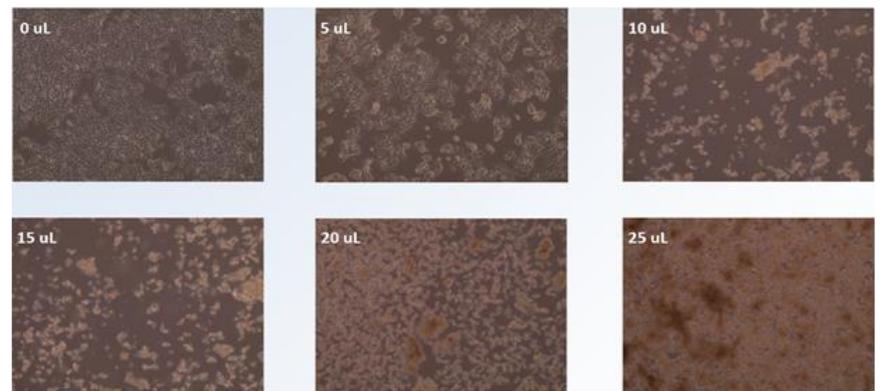
A



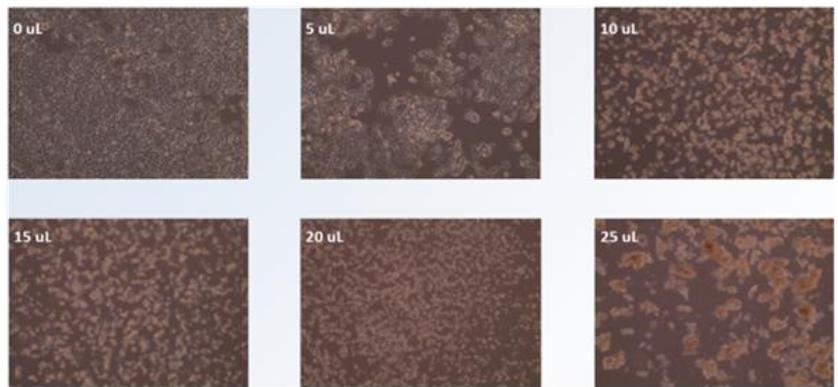
B



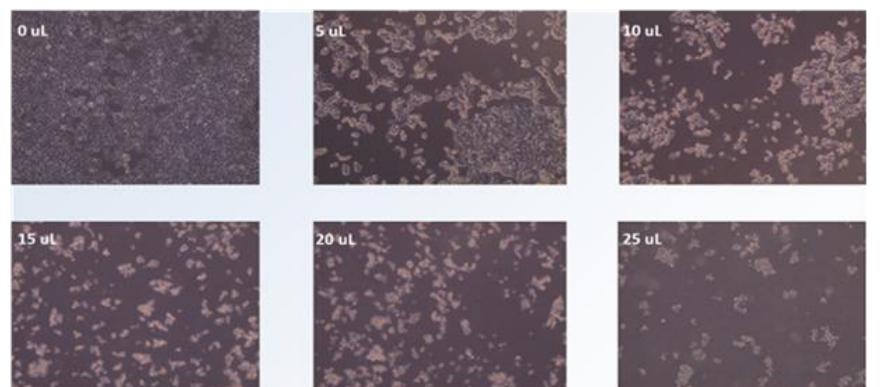
C



D

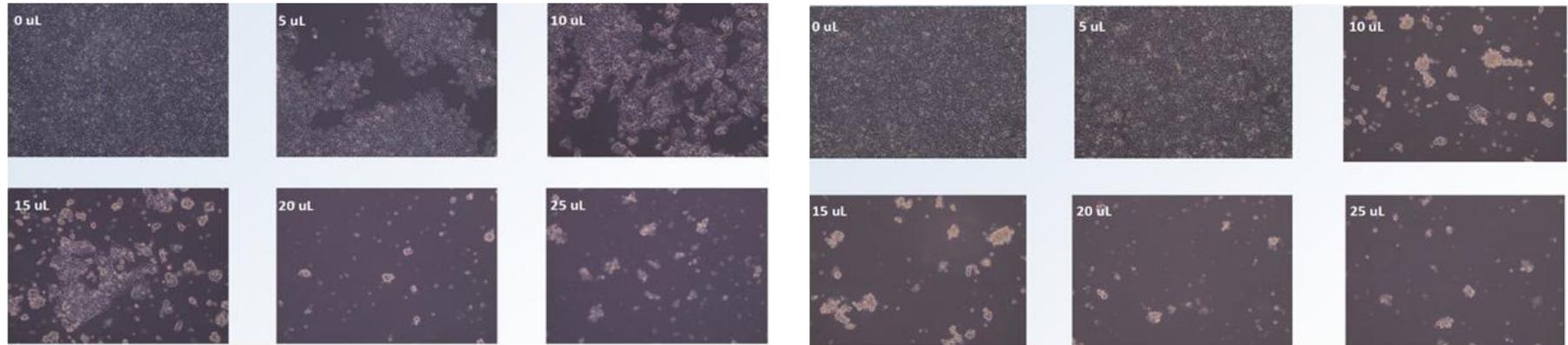


E



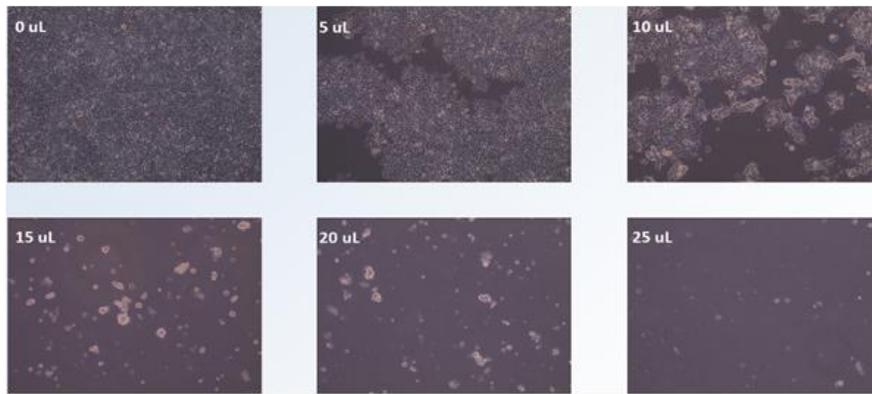
F

Susp. 48h

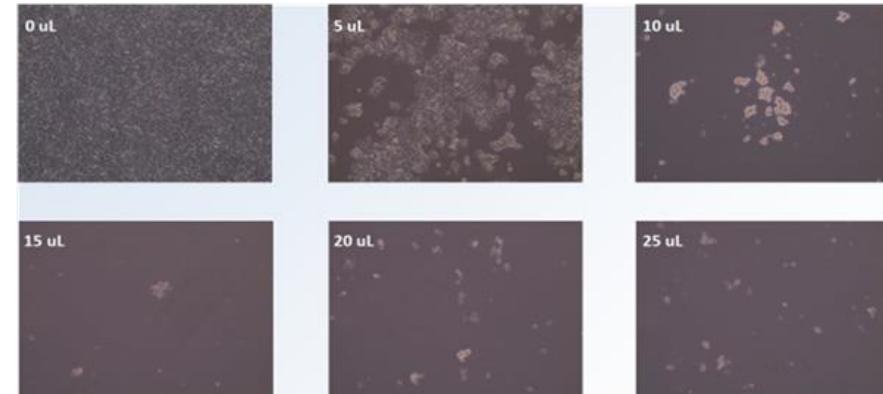


A

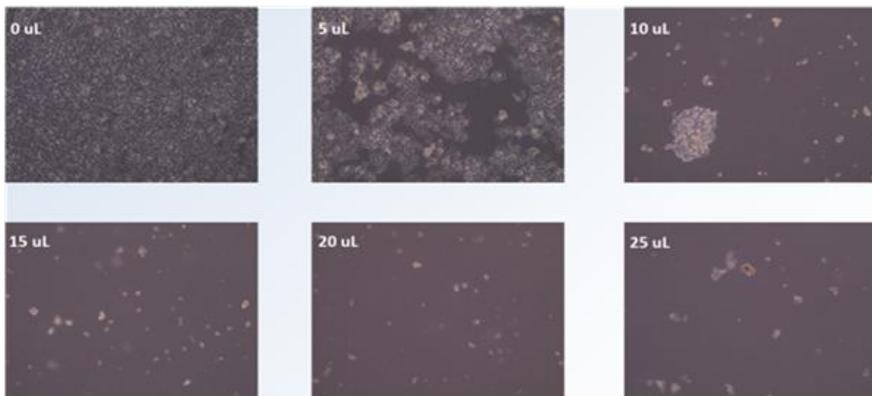
B



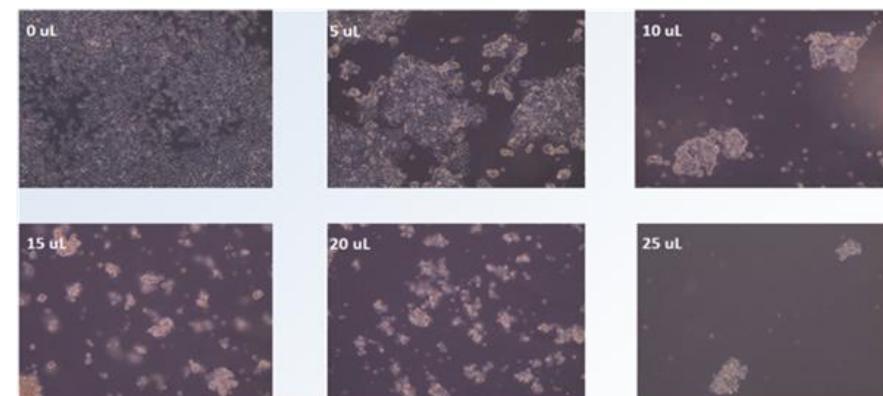
C



D



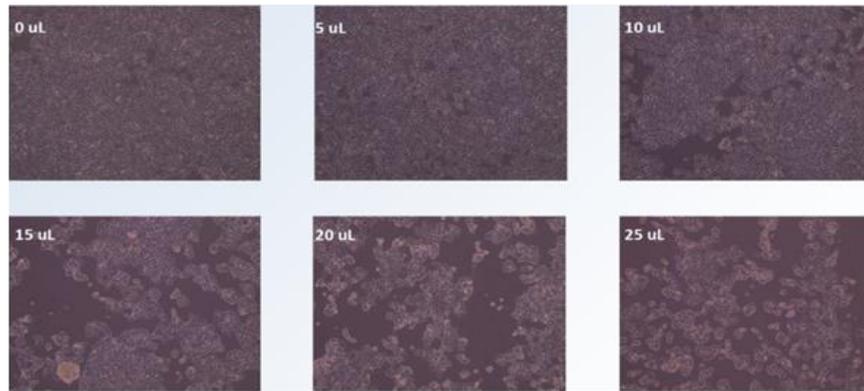
E



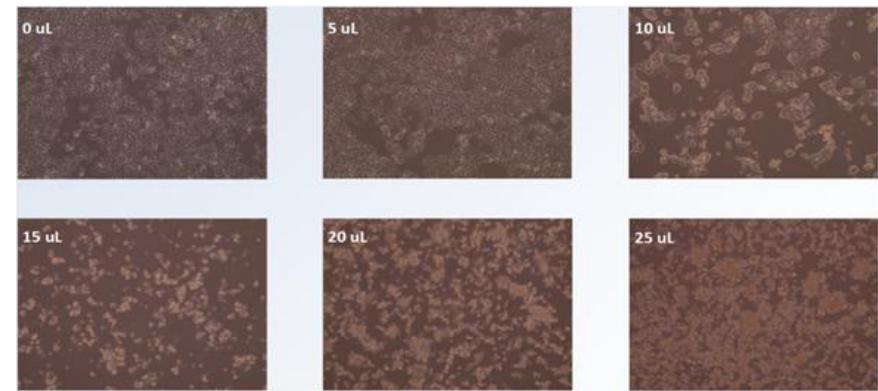
F

Figura 59. Continúa.

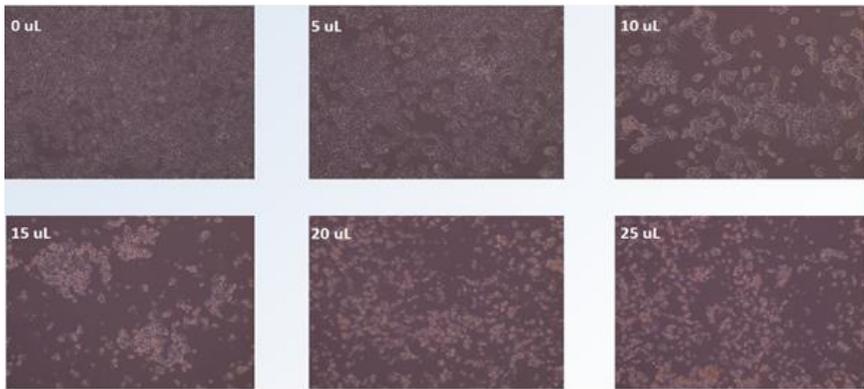
Fil.Lyo. 24h



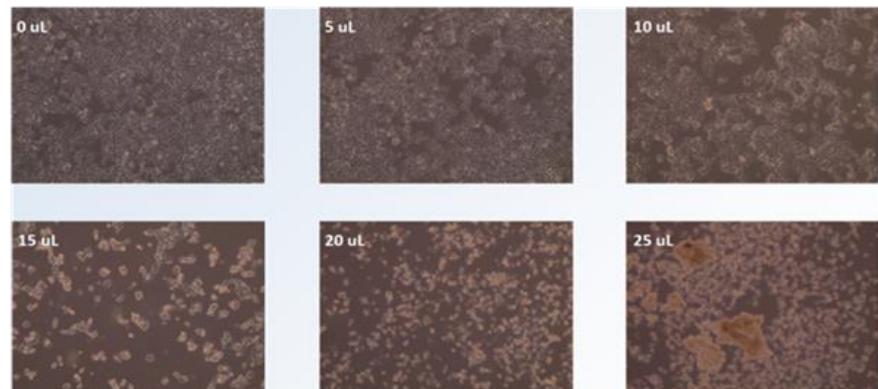
A



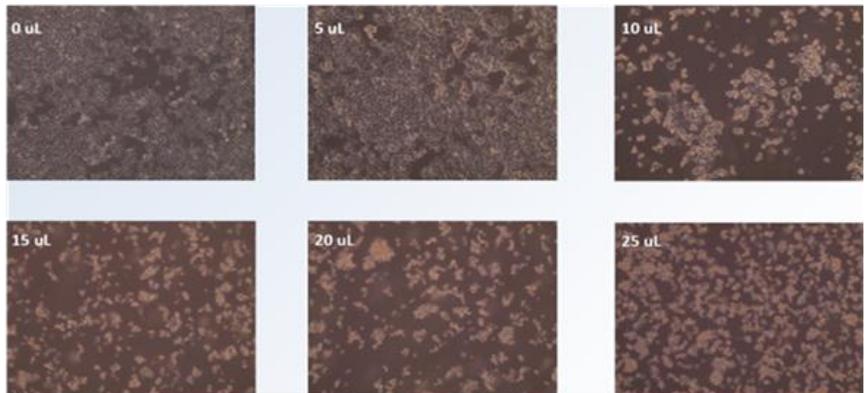
B



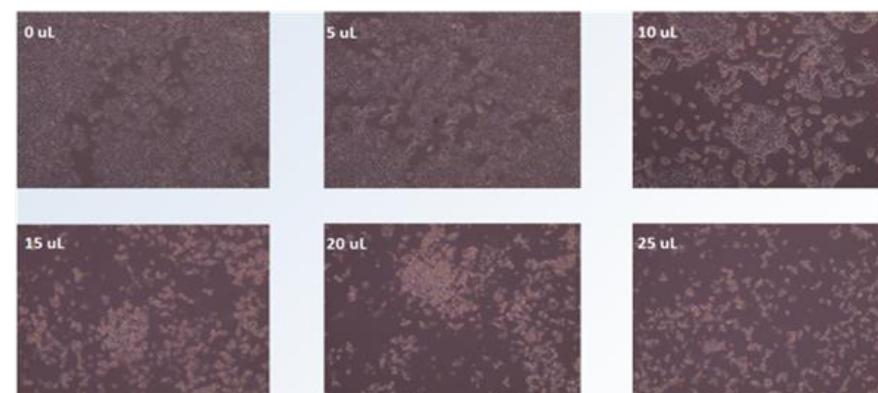
C



D



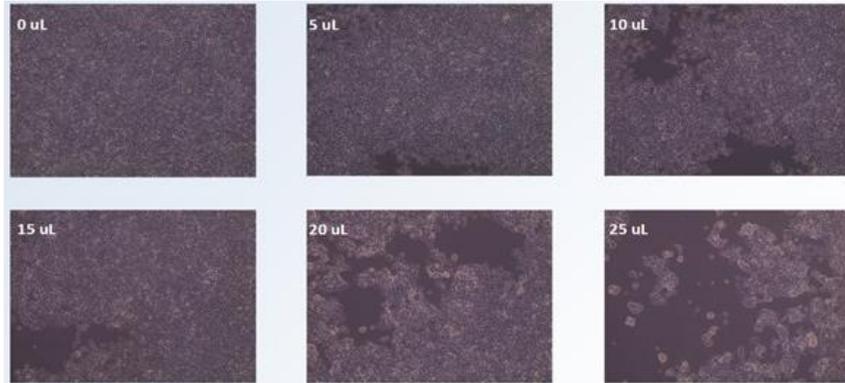
E



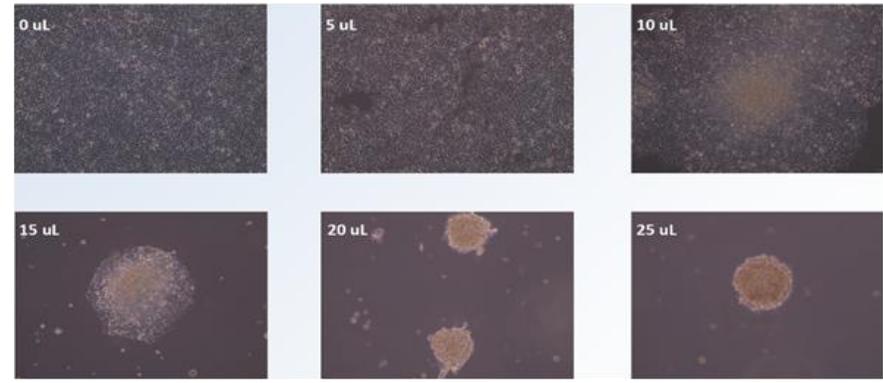
F

Figura 59. Continúa.

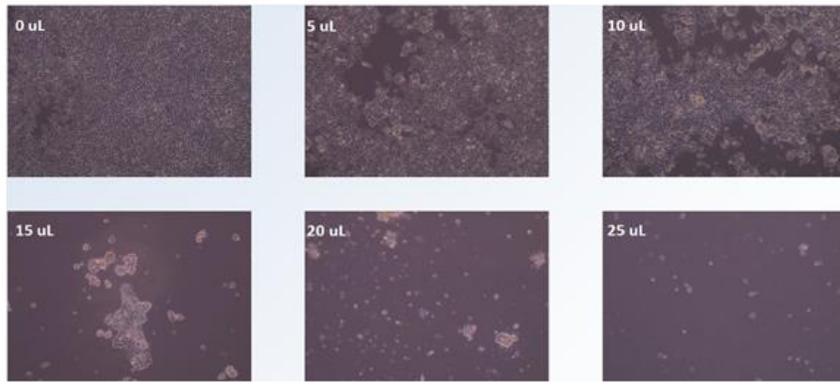
Fil.Lyo. 48h



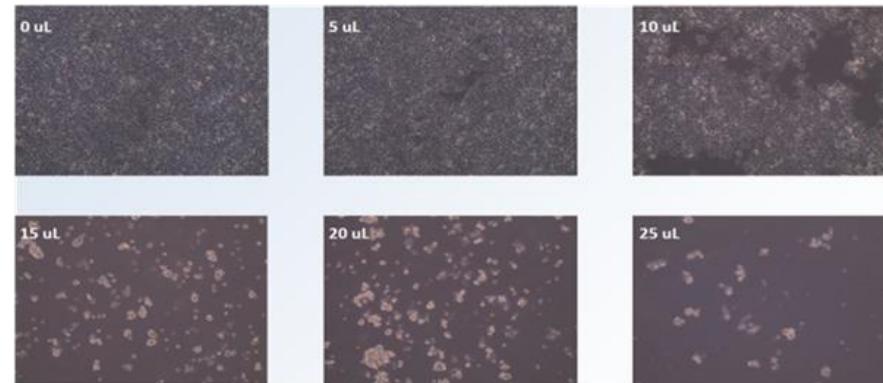
A



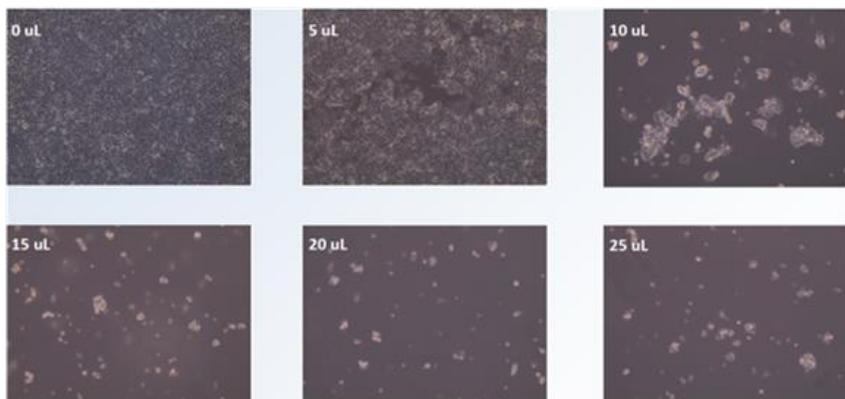
B



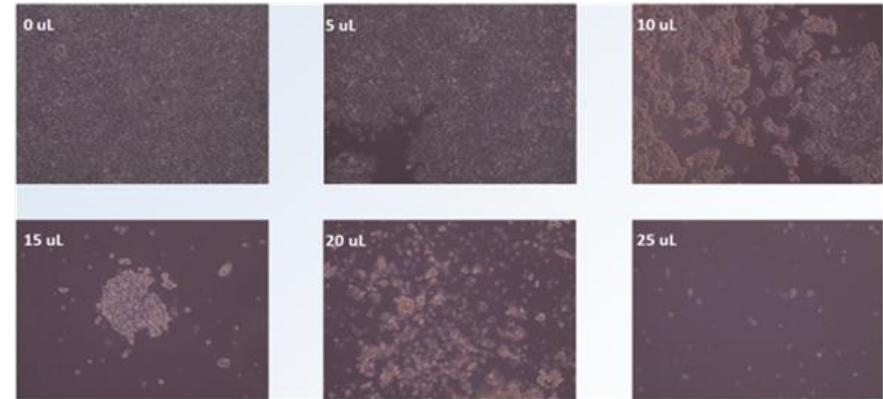
C



D



E



F

Figura 59. Imágenes de células HEK293T con diferentes volúmenes (0, 5, 10, 15, 20, 25 μL) y tipos de SLNs, tanto PEGiladas como sin PEGilar: (A) CO, (B) Brij S100, (C) DSPE, (D) Gelucire, (E) Myrj 52 y (F) Myrj 100 suspendidas en medio acuoso sin liofilizar (Susp.) y liofilizadas filtradas (Fil.Lyo.). Las fotografías fueron tomadas pasadas las 24 y 48 horas de incubación.

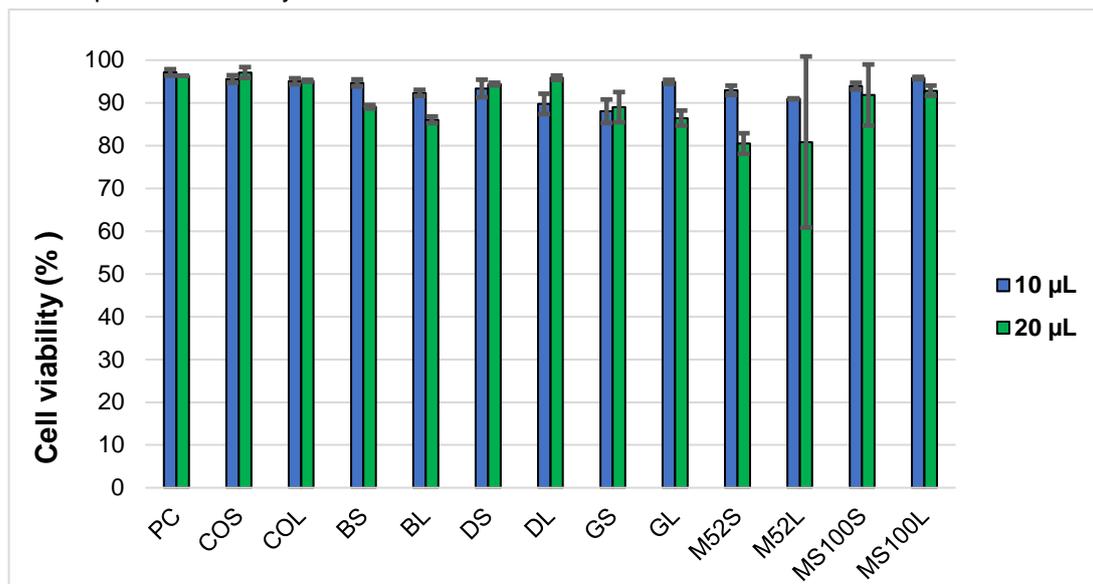


Figura 58. Viabilidad celular de células HEK293T después de 48 horas de incubación con dos volúmenes diferentes (10 μL y 20 μL) de PEG-cSLN en estados suspendidos sin liofilizar y liofilizados mediante citometría de flujo. Abreviaturas: PC, control positivo; COS, colesterol oleato suspendido sin liofilizar; COL, colesterol oleato liofilizado; BS, Brij S100 suspendido sin liofilizar; BL, Brij S100 liofilizado; DS, DSPE suspendido sin liofilizar; DL, DSPE liofilizado; GS, Gelucire suspendido sin liofilizar; GL, Gelucire liofilizado; M52S, Myrj 52 suspendido sin liofilizar; M52L, Myrj 52 liofilizado; MS100S, Myrj S100 suspendido sin liofilizar; MS100L, Myrj S100 liofilizado.

Resaltar que, la formulación liofilizada con DSPE presentó una mayor viabilidad con un volumen de 20 μL en comparación con 10 μL . Notablemente, el PEG Myrj S100 parece ser la formulación más prometedora, ya que en ambos estados presentó una viabilidad celular sobre el 90% con ambos volúmenes probados. Este hecho podría ser debido a una menor concentración de nanopartículas fruto de la filtración para la eliminación de aglomerados previamente descrita en la sección 4.1.4.1.

En cuanto a los ensayos de viabilidad/citotoxicidad celular utilizando las SLNs con cistamina, tanto PEGiladas como sin PEGilar, todas las formulaciones resultaron ser tóxicas para las células con volúmenes superiores a 5 μL , resultando así, menos viables que las PEG-cSLNs sin cistamina (Figura 60). Esto se debe a que los ensayos biológicos se realizaron con SLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar, dado a que la liofilización causó la aglomeración irreversible de estas nanopartículas. Así, como se esperaba, estas PEG-cSLNs con cistamina resultaron ser muy tóxicas para las células, puesto que están diluidas en un porcentaje bajo de etanol. Motivo por el cual, para poder potenciar estas nanopartículas se debería realizar un nuevo estudio y optimización del proceso de liofilización o buscar alguna otra alternativa para eliminar el etanol sin que se produzca la cristalización entre la cistamina y el ácido esteárico. Quizás una posible alternativa podría ser la eliminación de etanol mediante diálisis si no se pudieran liofilizar estas nanopartículas.

SLNs + Cys 24h

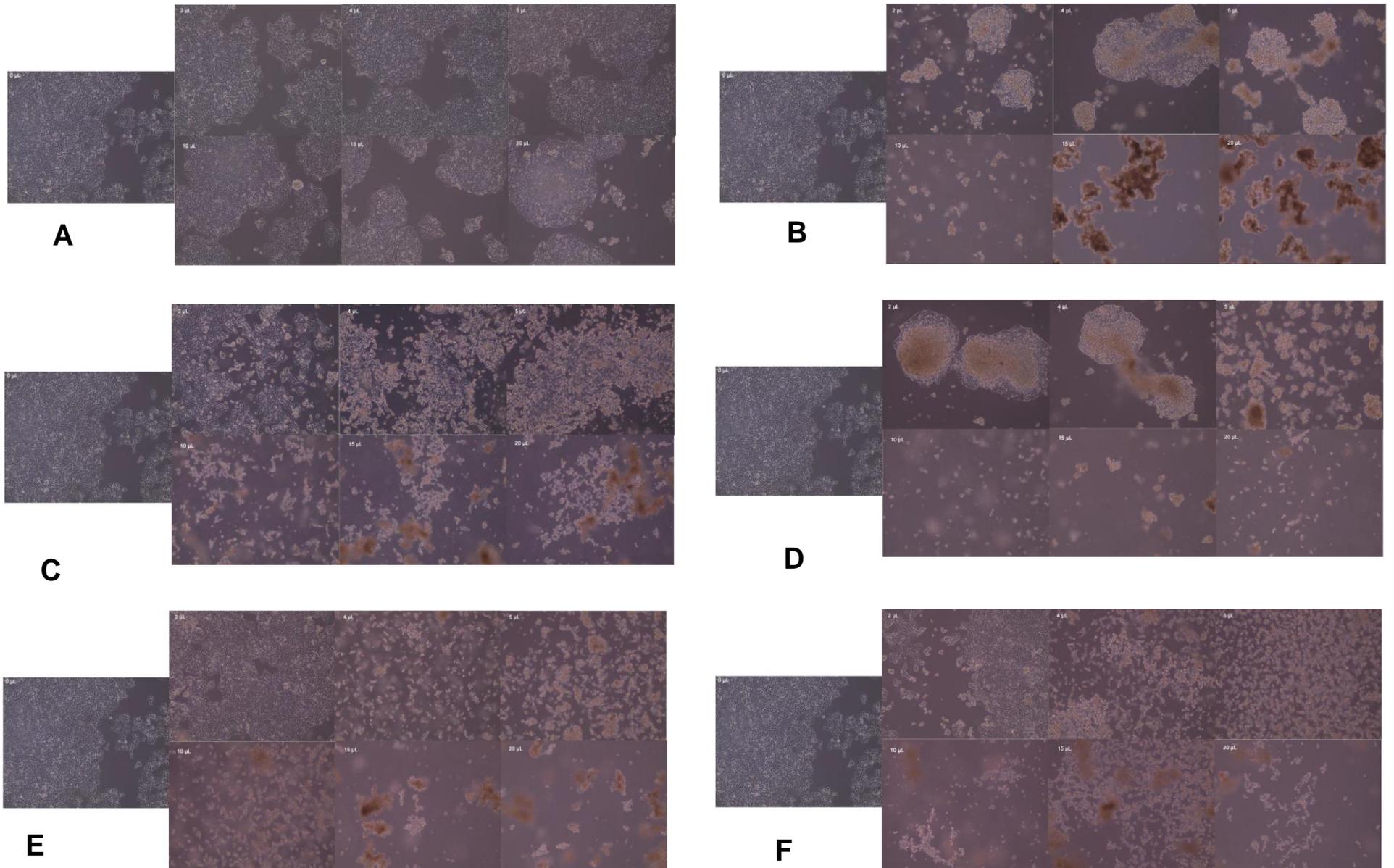


Figura 60. Continúa.

SLNs + Cys 48h

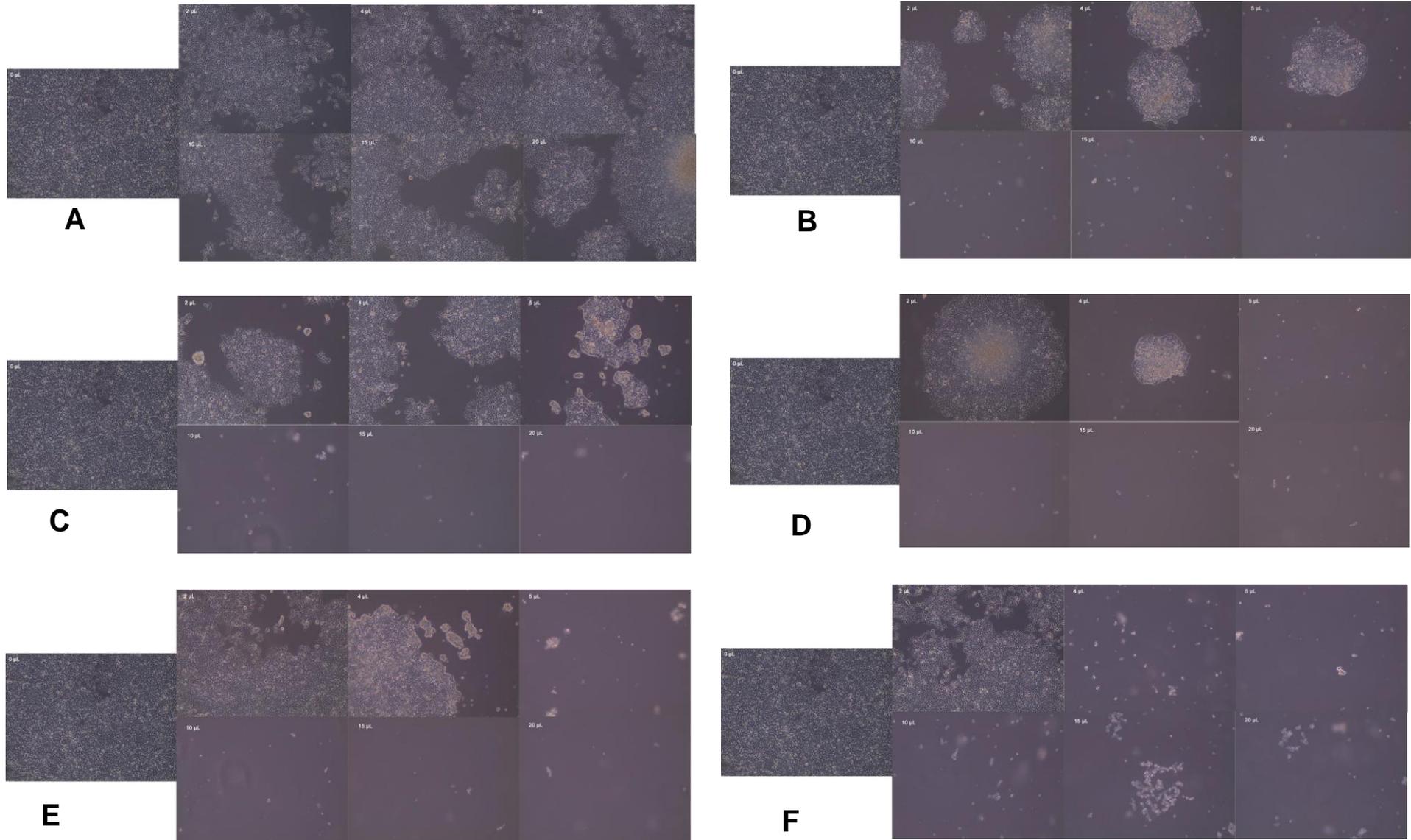


Figura 60. Imágenes de células HEK293T con diferentes volúmenes (0, 2, 4, 5, 10, 15, 20 μ L) y tipos de SLNs, PEGiladas y sin PEGilar, en cuya matriz se ha incorporado cistamina: (A) CO, (B) CO+Cys, (C) DSPE, (D) Myrj 52, (E) Tefose 63 y (F) Tefose 1500. Las fotografías fueron tomadas pasadas las 24 y 48 horas de incubación.

4.2.2 FORMACIÓN DE LOS SLNplejos CON LAS PEG-cSLNs

Se realizaron ensayos de retardo por medio de electroforesis en geles de agarosa, para evaluar la eficacia de unión de ácidos nucleicos con las PEG-cSLN. En este sentido, la eficiencia de carga se determinó evaluando la presencia de ADN libre no unido con las nanopartículas en los geles, reflejando así, la capacidad de unión de las nanopartículas PEGiladas. Tanto las PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar como liofilizadas formaron SLNplejos con un volumen de 10 μ L cuando la cantidad de ADN plasmídico fue entre 0.5 y 1.0 μ g de material genético (Figura 61). En cambio, cuando se utilizaron cantidades superiores a los 2 μ g, las PEG-cSLNs fueron incapaces de formar suficientes complejos, debido a que el ADN libre fue detectado en los geles. Sin embargo, las formulaciones con SLNs suspendidas sin liofilizar formaron complejos en todas las cantidades de material genético, excepto en la formulación con Myrj S100.

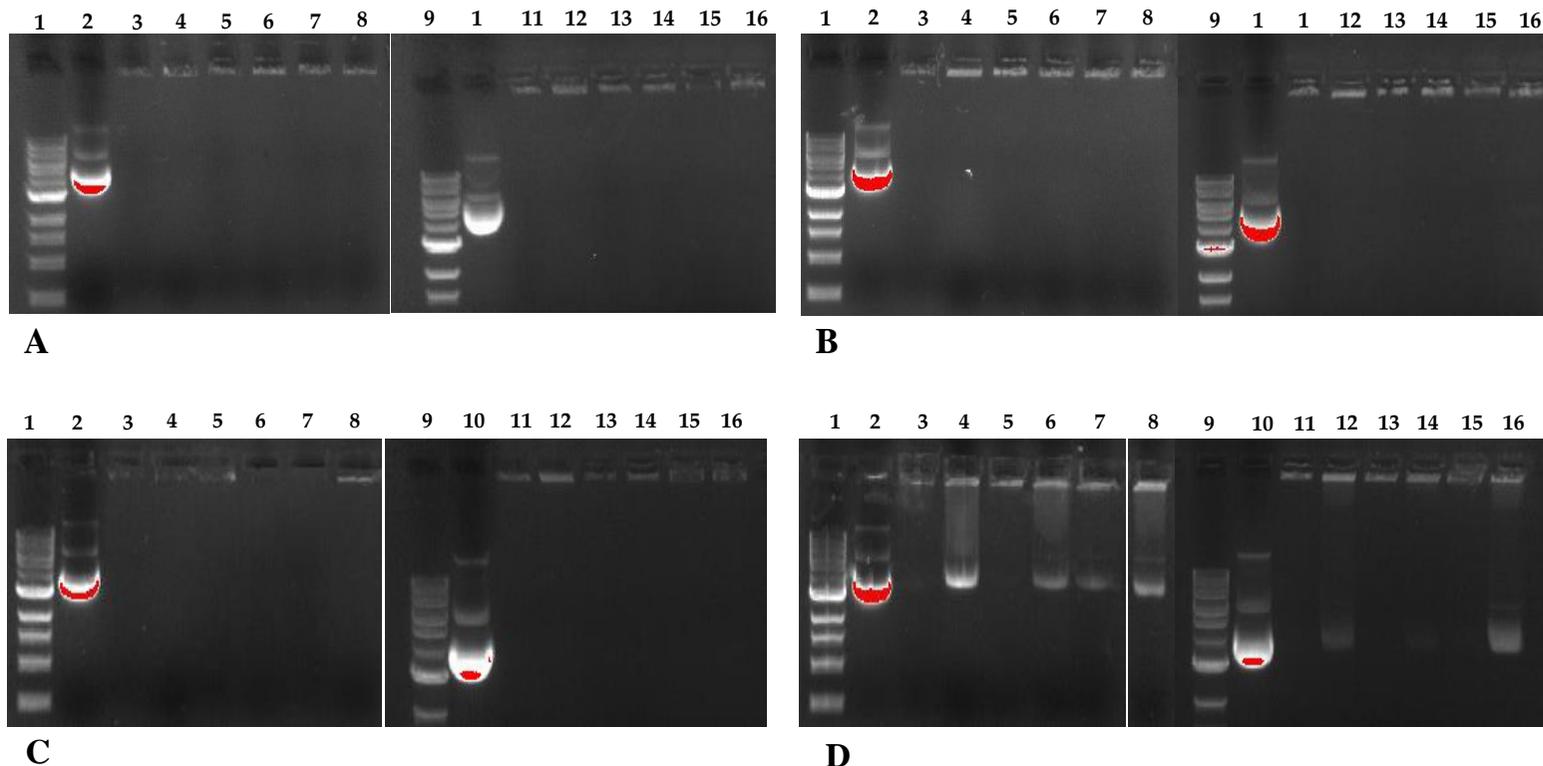


Figura 61. Electroforesis en gel de agarosa de los cinco diferentes complejos PEG-cSLN:ADN, tanto en estado suspendido sin liofilizar como liofilizado, con cantidades crecientes de ADN plasmídico. La imagen (A) corresponde a 500 ng de ADN, la imagen (B) a 750 ng, la imagen (C) a 1000 ng y la imagen (D) a 2000 ng. Carriles 1 y 9: escalera de ADN; carriles 2 y 10: plásmido de luciferasa MHC; carriles 3 y 4: oleato de colesterol suspendido sin liofilizar y liofilizado; carriles 5 y 6: DSPE suspendido sin liofilizar y liofilizado; carriles 7 y 8: Myrj S100 suspendido sin liofilizar y liofilizado; carriles 11 y 12: Gelucire suspendido sin liofilizar y liofilizado; carriles 13 y 14: Myrj 52 suspendido sin liofilizar y liofilizado; carriles 15 y 16: Brij S100 suspendido sin liofilizar y liofilizado.

La capacidad de las CO-cSLNs para formar complejos se ha reportado previamente (109,148). En este sentido, los resultados confirmaron la idoneidad de estas PEG-cSLNs para poderse unir con material genético, tanto en estado suspendido sin liofilizar como liofilizado, a pesar de la incorporación de la PEGilación. Mientras la PEGilación reduce la carga superficial (ZP), lo cual podría afectar la capacidad de unión entre las nanopartículas y el ADN, la carga positiva restante fue suficiente para facilitar la formación de SLNplejos en todas las formulaciones con PEG. Notablemente se pudo evidenciar que el potencial Z aumentó después del proceso de liofilización, mejorando la facilidad de formación de los SLNplejos.

Adicionalmente, se pudo determinar que las SLNs con cistamina, tanto PEGiladas como sin PEGilar, formaron complejos con material genético cuando la cantidad de ADN plasmídico fue entre 0.5 y 1.0 μ g a pesar de que el volumen utilizado fue apenas de 2 μ L (Figura 62). Este resultado se corrobora con el potencial zeta determinado en las secciones 4.1.7 y 4.1.8.3. De igual manera que las PEG-cSLNs sin cistamina, no se pudieron formar complejos utilizando cantidades superiores a los 2 μ g de ADN plasmídico.

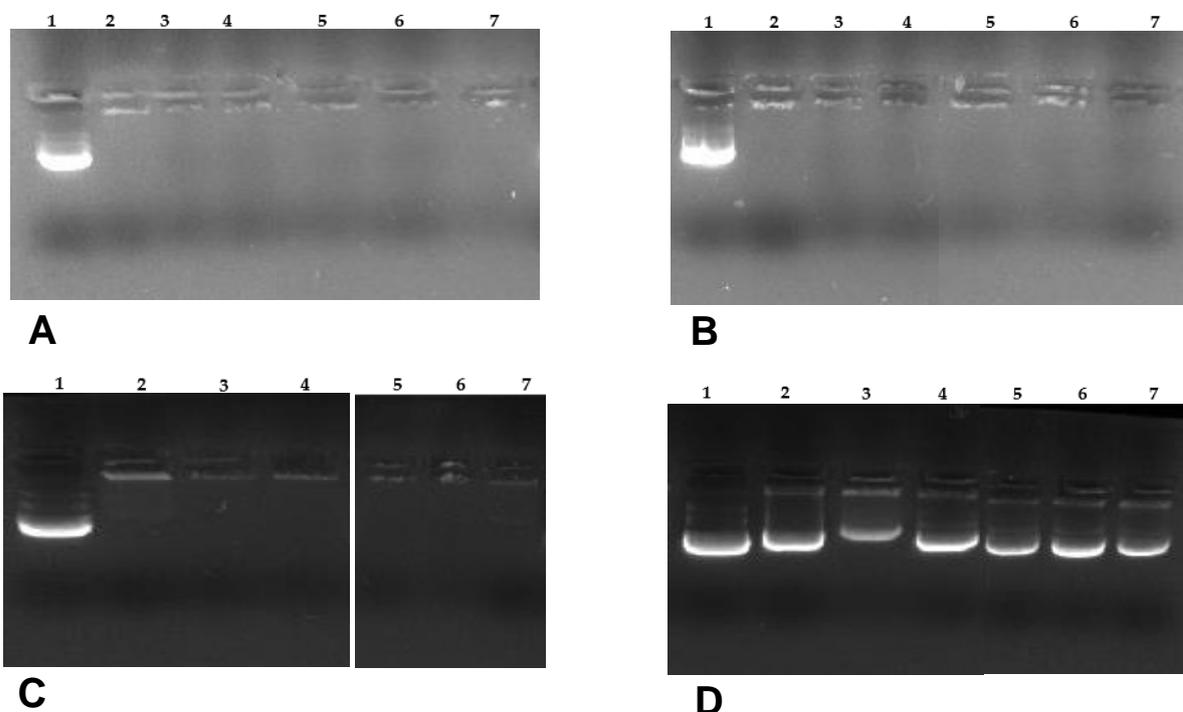


Figura 62. Electroforesis en gel de agarosa de seis diferentes complejos SLNs:ADN con PEG y sin PEG, en cuya matriz se ha incorporado cistamina (Cys). Distintas cantidades crecientes de ADN plasmídico fueron evaluadas. La imagen (A) corresponde a 250 ng de ADN, la imagen (B) a 500 ng, la imagen (C) a 1000 ng y la imagen (D) a 2000 ng. Carril 1: plásmido de luciferasa MHC; carriles del 2 al 7 pertenecen a los siguientes complejos en el siguiente orden: colesterol oleato (CO), CO+Cys, DSPE+Cys, Myrj 52+Cys, Tefose 63+Cys y Tefose 1500+Cys.

4.2.3 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK293T CON LAS PEG-cSLNs

Una vez determinado el volumen de PEG-cSLNs (10 μ L) que resultó viable y capaz de formar complejos con material genético, se procedió a transfectar células HEK293T con el plásmido MHC mediante la aplicación de las PEG-cSLNs. En comparación con el control positivo (Lipofectamina), el número de células transfectadas fue significativamente bajo en todas las formulaciones desarrolladas, incluyendo las SLNs sin PEG (CO). Además, se puede observar que la transfección utilizando las PEG-cSLNs fue claramente menor en comparación con las CO-cSLNs (Figura 63). Cabe subrayar que todos estos estudios se hicieron con formulaciones previas a la optimización del proceso de liofilización. Así, estos resultados indican que tanto al añadir un nuevo excipiente a la formulación base como también el estrés generado por el proceso de liofilización, alteran las propiedades fisicoquímicas originales de las SLNs. Por lo tanto, si se logran mantener intactas las características fisicoquímicas de las nanopartículas, potencialmente se podrían alcanzar mejores resultados de transfección celular. Por lo que, con un proceso de liofilización optimizado, que no genere tanto estrés a las PEG-cSLNs, y mantengan en condiciones adecuadas las propiedades fisicoquímicas, se podrían conseguir transfecciones más eficaces.

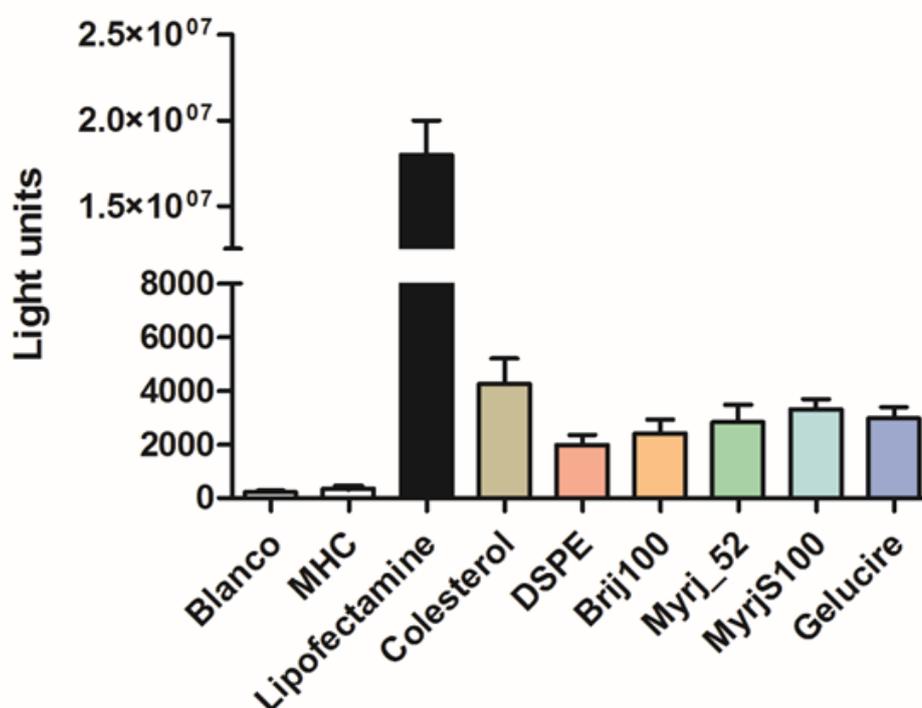


Figura 63. Eficiencia de transfección mediante la aplicación de diferentes tipos de PEG-cSLNs (DSPE, Brij S100, Myrj 52, Myrj S100 y Gelucire). Cada muestra se realizó por triplicado. El blanco representa al tratamiento sin plásmido ni agente de transfección (Lipofectamine 2000); el control negativo contiene sólo el plásmido (MHC); el control positivo el plásmido con la Lipofectamine 2000; y el colesterol son las SLNs sin PEG (CO).

Asimismo, se transfectaron células HEK293T con apenas 2 μL de PEG-cSLNs con cistamina debido a que estas nanopartículas presentaron una alta citotoxicidad, cuyos resultados fueron descritos en la sección 4.2.1. Se puede observar claramente que todas las formulaciones con cistamina presentaron, incluyendo las CO-cSLNs, tasas de transfección muy bajas (Figura 64) en comparación con las PEG-cSLNs sin cistamina. Estos resultados corroboran los datos obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, puesto que al ser estas PEG-cSLNs muy tóxicas para las células, evidentemente las tasas de transfección serán muy bajas.

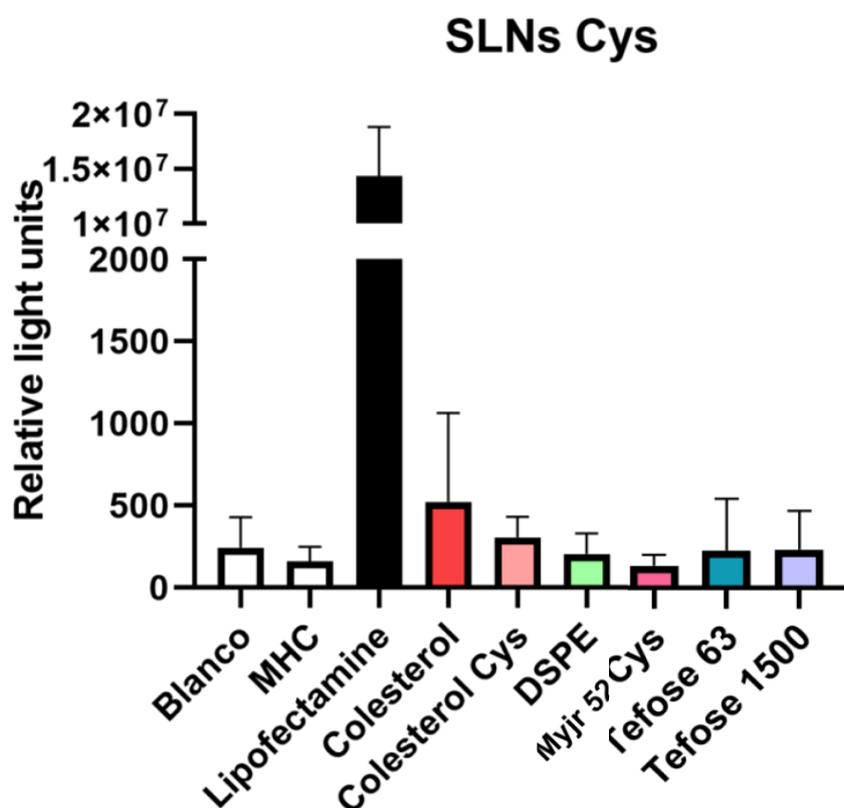


Figura 64. Eficiencia de transfección mediante la aplicación de diferentes tipos de PEG-cSLNs (DSPE, Brij S100, Myrj 52, Myrj S100 y Gelucire), en cuya matriz se ha incorporado cistamina (Cys). Cada muestra se realizó por triplicado. El blanco representa al tratamiento sin plásmido ni agente de transfección (Lipofectamine 2000); el control negativo contiene sólo el plásmido (MHC); el control positivo el plásmido con la Lipofectamine 2000; y el colesterol son las SLNs sin PEG (CO) y sin cistamina (Cys). Todas las nanopartículas de las demás formulaciones contienen cistamina en su matriz lipídica.

En conclusión, queda pendiente para el grupo de investigación evaluar las propiedades biológicas de las PEG-cSLNs liofilizadas mediante un proceso de liofilización optimizado. Esto podría potencialmente resultar en tasas de transfección del plásmido más favorables, dado que las características fisicoquímicas de las PEG-cSLNs no se verían comprometidas debido al estrés ejercido por la liofilización. Asimismo, es probable que la captación celular sea mayor en comparación con las PEG-cSLNs

liofilizadas mediante un ciclo convencional, en el cual, no se ha llevado a cabo un estudio de los parámetros del proceso de liofilización.

Además, queda claro que se tiene que estudiar los parámetros para luego optimizar un nuevo proceso de liofilización que permitan liofilizar las PEG-cSLNs con cistamina para de esta manera asegurarse que el poco remanente de etanol que pueda quedar en la suspensión coloidal desaparezca por completo, y se elimine la alta toxicidad que presentaron estas nanopartículas en los ensayos de citotoxicidad. Si no es posible liofilizar las PEG-cSLNs con cistamina, quizás otros métodos para eliminar el etanol se tendrían que emplear, entre ellos, realizar diálisis a estas suspensiones y liofilizarlas o a su vez realizar los ensayos biológicos con las nanopartículas en suspensión acuosa sin liofilizar.

5. DISCUSIÓN GENERAL

La terapia génica y terapias con ARN son un campo que ha experimentado una notable evolución en los últimos años, consolidándose como una estrategia prometedora y revolucionaria para el tratamiento de diversas enfermedades genéticas y adquiridas, entre las que se incluyen el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Este progreso se ha visto impulsado por avances significativos en la comprensión de la biología molecular y en la tecnología de transporte y entrega de ácidos nucleicos terapéuticos (3,4,55). No obstante, uno de los principales desafíos en este campo es lograr una entrega eficiente del ácido nucleico a las células diana, dado su potencial para modular la expresión génica y tratar una amplia gama de enfermedades incluyendo enfermedades virales. Efectivamente, las herramientas basadas en la tecnología del ADN y ARN se conocen desde hace décadas, pero la capacidad de administrar estas biomoléculas para que logren realizar el efecto terapéutico deseado con éxito sin ser degradadas previamente requiere de más esfuerzos e inversión en investigación en el desarrollo de nuevos vectores (55,77,78). Este desafío se centra principalmente en el ámbito galénico.

En este contexto, los vectores no virales han ganado interés como alternativas prometedoras, seguras y eficaces frente a los vectores virales tradicionales, debido a su capacidad para evitar respuestas inmunes adversas y ofrecer un perfil de seguridad más adecuado. Entre estos, las nanopartículas sólidas lipídicas (SLNs) han emergido como herramientas versátiles de entrega de ácidos nucleicos, gracias a su capacidad para transportar y entregar eficientemente ADN/ARN terapéutico a las células diana. Las SLNs ofrecen ventajas significativas, como una mayor estabilidad, biocompatibilidad, capacidad de carga de ácido nucleico y su potencial para la modificación superficial, lo que las convierte en candidatas ideales para aplicaciones terapéuticas (62,73,92,126). Prueba de ello es que las terapias con ARN actualmente comercializadas en el mercado con nanotransportadores son a base de nanopartículas lipídicas (133).

En esta tesis doctoral, se investigó la viabilidad y eficacia de formulaciones preexistentes de cSLN con colesteril oleato (CO-cSLN) como portadores de ácidos nucleicos para terapia génica, más concretamente para el transporte de plásmidos, con un enfoque en la incorporación de excipientes PEGilados, cuyas propiedades multifuncionales se exploraron en detalle. Cabe recalcar que actualmente no se ha conseguido desarrollar con éxito ninguna formulación a base de nanopartículas capaces de transfectar plásmidos que esté en el mercado, debido principalmente al gran tamaño de estas biomoléculas.

En los últimos años, se han registrado avances significativos en la ingeniería de vectores no virales para lograr una entrega eficiente de ARN. La incorporación de excipientes PEGilados en las SLNs han evidenciado mejoras significativas en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Estos excipientes desempeñan un papel clave como estabilizadores de la nanopartícula, reduciendo la agregación y mejorando la estabilidad coloidal tanto durante el almacenamiento como en la fase de administración. Asimismo, promueven la reducción de la respuesta inmune, brindan protección contra enzimas y mejoran la capacidad de transfección de ADN/ARN (142,147,162).

Los excipientes PEGilados también pueden modular la interacción de las SLNs con las células diana, mejorando así la eficiencia de transfección y reduciendo la toxicidad. Adicionalmente, proporcionan una superficie funcional susceptible de ser modificada para potenciar tanto la capacidad de carga como la especificidad de entrega de ARN (144). En definitiva, los excipientes PEGilados desempeñan un papel crucial en la optimización de las SLNs como vectores de entrega de ARN, incrementando su eficacia terapéutica y su potencial clínico.

En este sentido, es relevante hacer hincapié en que la selección de los excipientes PEGilados utilizados en esta tesis, se basó en una revisión bibliográfica que respalda su idoneidad para no comprometer el propósito y la filosofía del grupo de investigación, que se centra en el desarrollo de medicamentos eficaces, reproducibles, seguros y económicamente viables. En consecuencia, se consideró fundamental que el PEG empleado no fuera excesivamente costoso y que no interfiriera con el método de fabricación existente, el cual se considera fácilmente escalable, además de evitar el uso de disolventes orgánicos.

Inicialmente, se seleccionaron cinco PEGs (Brij S100, DPSE, Gelucire, Myrj 52 y Myrj S100) para llevar a cabo un análisis preliminar (*screening*) y evaluar la viabilidad de su incorporación en la superficie de las CO-SLNs. Posteriormente, basándose en los resultados de este análisis, se añadieron dos PEGilados adicionales (Tefose 63 y Tefose 1500), ya que su balance hidrófilo-lipofílico (HLB) se asemejaba más al de las emulsiones o/w. Todos estos excipientes han demostrado ser biocompatibles en estudios previos que utilizaron nanopartículas PEGiladas, sin evidenciar toxicidad severa en dosis agudas o crónicas. Además, todos los PEGs fueron elegidos considerando el proceso de fabricación, ya que se necesitan excipientes con puntos de fusión por debajo de los 70 °C. En este sentido, los puntos de fusión de todos los PEGs utilizados se encontraban en el rango de 50–60 °C.

El primer paso consistió en determinar la viabilidad de formar nanopartículas utilizando estos excipientes, o si, por el contrario, se obtenían partículas de mayor tamaño. Las pruebas iniciales indicaron la posibilidad de incorporar este excipiente para continuar con la formación de las PEG-cSLNs, lo que llevó a realizar un estudio para determinar la cantidad óptima de PEG a incorporar en la formulación. Se diseñaron varias formulaciones con diferentes cantidades de PEG, variando desde un mínimo de 50 mg/lote hasta un máximo de 350 mg/lote. Tal como se ha expuesto en los resultados, la suma de ácido esteárico, colesteryl oleato y PEG debe ser de 500 mg, dado que esta proporción fue determinada como óptima para formar la capa matricial de las SLNs desarrolladas en una tesis anterior del mismo grupo de investigación.

Como resultado, se fabricaron cuatro formulaciones distintas, cada una utilizando un tipo específico de PEG (Brij S100, Gelucire, Myrj 52 y Myrj S100), con cantidades variables (50, 150, 250, 350 mg). La proporción de ácido esteárico (SA) y colesteryl oleato (CO) que conforman la matriz de las PEG-cSLNs depende de la cantidad de PEG añadida, manteniendo una relación de 3/5 de CO y 2/5 de SA para alcanzar un total de 500 mg, constituyendo así la matriz sólida lipídica de las PEG-cSLNs.

En todas las formulaciones con diferentes cantidades de PEG, se obtuvieron SLNs con tamaños entre los 200 y 300 nm, dependiendo de la cantidad de PEG empleado. En la mayoría de las formulaciones que emplearon 50 mg de PEG, excepto aquella con el PEG Myrj S100, tanto el tamaño de partícula como el Pdl aumentaron, indicando la formación de posibles aglomerados. No obstante, en casi todas las formulaciones, excepto aquella con el PEG Brij S100, se logró obtener nanopartículas estables con tamaños de partícula cercanos a los 200 nm y un Pdl > 0.2 al emplear 150 mg de PEG. Este resultado es relevante, ya que esta cantidad de excipiente PEGilado se utilizará en la fabricación de PEG-cSLNs para continuar con los siguientes ensayos, incluyendo liofilización, morfología, estabilidad, toxicidad, formación de complejos con material genético y transfección celular mediante estas nanopartículas PEGiladas. En consecuencia, las cantidades de la formulación final fueron 140 mg de ácido esteárico, 210 mg de colesteryl oleato y 150 mg de PEG.

Curiosamente, el PEG Brij S100 presentó un menor tamaño de partícula (menos aglomeración) a medida que aumentaba la cantidad de PEG empleado. Por lo tanto, fue el único excipiente que, al utilizar 350 mg de PEG, mostró el tamaño de partícula más pequeño (166.2 nm). Sin embargo, es relevante ser cauteloso al determinar la cantidad de PEG a incorporar, pues un exceso de este excipiente puede interferir en la transfección celular. En cuanto al potencial zeta, éste varió entre las diferentes

formulaciones, siendo el PEG Brij S100 el que presentó el menor potencial Z (23.7 mV) entre todos los PEGs, mientras que los otros tres PEGs mostraron potenciales alrededor de los 30 mV, manteniéndose dentro del rango óptimo (20–45 mV) para permitir la unión del material genético a las PEG-cSLNs y favorecer su adecuada liberación una vez dentro de la célula.

Por último, el PEG DSPE no se utilizó en estos ensayos preliminares hasta que se establezca la cantidad adecuada de PEG para utilizar. Dado que es el PEG más costoso y no se dispone de grandes cantidades, es necesario reservar este excipiente para ensayos específicos una vez que se haya definido el método de fabricación y se hayan confirmado la estabilidad y repetibilidad de las características fisicoquímicas de las PEG-cSLNs en todos los procesos de fabricación.

A pesar de que los resultados preliminares de caracterización de las PEG-cSLNs fabricadas y sus características galénicas no alcanzaron las expectativas iniciales, se implementaron diversas estrategias para reducir el tamaño de partícula y mejorar su capacidad de penetración y eficacia terapéutica *in vivo*. Estas estrategias se basaron en una revisión bibliográfica sobre la reducción del tamaño de partícula, explorando métodos tanto físicos como químicos (cistamina) para alcanzar este objetivo.

La primera estrategia consistió en prolongar el tiempo y aumentar la velocidad de ultra agitación durante el proceso de fabricación de las nanopartículas, modificando así el protocolo original. Como resultado de esta modificación, al comparar el tamaño de partícula entre las cinco PEG-cSLNs (incluido DSPE) y las nanopartículas sin PEGilar (CO-cSLNs) mediante el protocolo de manufactura de las SLNs modificado, se observó una reducción significativa del tamaño de partícula que oscilaba entre 30 a 50 nm, siendo Gelucire y DSPE los PEGs que mostraron los tamaños de partícula más pequeños (~170 nm). Asimismo, las CO-cSLNs exhibieron una reducción en el tamaño de partícula de 237 a 202 nm, lo que sugiere que sería recomendable aplicar esta modificación en el protocolo de manufactura para futuras fabricaciones bajo este método.

En cuanto a las otras características fisicoquímicas, tanto el Pdl como el ZP se mantuvieron dentro de los parámetros óptimos, lo que indica una población monodispersa y potenciales dentro del rango de 20–45 mV. Con estos resultados obtenidos y la implementación del protocolo modificado, se realizaron análisis estadísticos para determinar el impacto que tiene la PEGilación sobre las características

fisicoquímicas de las nanopartículas, comparando el tamaño de partícula, el Pdl y el ZP de las PEG-cSLNs con las CO-cSLNs.

Como resultado, se evidenció que la incorporación de un nuevo excipiente afectó a las propiedades fisicoquímicas, especialmente el tamaño de partícula. Todas las PEG-cSLNs presentaron tamaños menores en comparación con las nanopartículas sin PEGilar, lo que incide en una mayor estabilidad y menor aglomeración, coincidiendo con los estudios de estabilidad que se discutirán más adelante. Este efecto se debe principalmente al cambio que el PEG provoca en la superficie de las SLNs, generando una barrera estérica que evita la aglomeración de las partículas y las mantiene separadas, lo que resulta en nanopartículas PEGiladas con tamaños menores (~180 nm) en contraste con las sin PEGilar (~200 nm).

Es esencial considerar las características de la capa que produce el PEG alrededor de la nanopartícula, ya que determina la propiedad de “invisibilidad”, es decir, la capacidad de la nanopartícula para no ser detectada como un agente extraño por el sistema inmune del paciente. Estas propiedades se basan en la flexibilidad que tienen las cadenas que conforman el PEG sobre el área superficial de la nanopartícula, ya que son determinantes para el exitoso revestimiento de la nanopartícula. Asimismo, la eficacia del revestimiento de las SLNs depende de la longitud, la densidad superficial y la configuración de las cadenas del PEG, sean éstas en forma de hongo o cepillo (139). Cada tipo PEG determina las características fisicoquímicas únicas de cada formulación. Los diferentes polímeros con distintas conformaciones producen variaciones en la superficie de las nanopartículas, afectando el tamaño, dispersión y carga (127).

Otro aspecto notable fue la significativa disminución del potencial zeta en todas las PEG-cSLNs, pero manteniéndose dentro del rango óptimo para formar los complejos. Esta reducción del potencial podría atribuirse a la disminución del área superficial causada por la incorporación del PEG en la superficie de la nanopartícula, lo que resulta en un descenso de la carga superficial. Es fundamental considerar las características fisicoquímicas de las nanopartículas, ya que se ha reportado que la eficiencia de transfección depende de su fabricación (66). De este modo, nanopartículas bien elaboradas potencialmente podrán transportar de manera más eficiente el material genético.

En este sentido, la caracterización de las propiedades fisicoquímicas son factores que indican la calidad del proceso de fabricación de las nanopartículas (191). El tamaño de partícula es un atributo crítico que está directamente relacionado con el Pdl: a medida

que la dispersión de las nanopartículas aumenta, la aglomeración y por consiguiente el tamaño de partícula también aumenta. Estos dos parámetros acreditan la calidad de las partículas en referencia a la distribución de tamaños, el cual es el principal atributo fisicoquímico que influencia la captación celular dependiente de endocitosis. De este modo, los mecanismos de internalización celular están determinados por el tamaño de partícula, las propiedades superficiales (carga), la forma y los tipos de células involucradas (189,192).

Una vez establecido el protocolo de fabricación de las PEG-cSLNs y determinadas las características fisicoquímicas de las nanopartículas, se procedió a liofilizar las cinco formulaciones diferentes de PEG (Brij S100, DPSE, Gelucire, Myrj 52 y Myrj S100) utilizando una receta convencional de liofilización, con la temperatura de transición vítrea (T_g) identificada mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) como referencia. De estas formulaciones, el PEG Myrj S100 presentó la T_g más baja ($-38\text{ }^\circ\text{C}$), lo que representó un desafío, dado que esta temperatura es demasiado baja y requiere trabajar a temperaturas mínimas de $-55\text{ }^\circ\text{C}$. Se recomienda comenzar el proceso de liofilización siempre $10\text{--}20\text{ }^\circ\text{C}$ por debajo de la T_g . Investigaciones previas sugirieron el uso de trehalosa como agente de carga para liofilizar las CO-SLNs, por lo que se empleó este disacárido en las liofilizaciones iniciales. Es esencial utilizar agentes crioprotectores para proteger las nanopartículas del estrés ocasionado por la liofilización, especialmente durante la fase de congelación y el secado primario. En estas primeras liofilizaciones, se utilizó trehalosa al 5% como crioprotector para evitar la aglomeración de las PEG-cSLNs.

Las SLNs abarcan lípidos sólidos dispersos en una solución acuosa con surfactantes (tensoactivos), en donde, los lípidos usados son típicamente sólidos a temperatura ambiente. Los surfactantes no iónicos proporcionan estabilización estérica a las partículas lipófilas, en este caso las SLNs, puesto que el carácter lipofílico y su idéntico mecanismo de estabilización en medio acuoso apuntan que también es similar después de la liofilización. No obstante, el número de productos liofilizados con nanopartículas en el mercado es limitado a causa de la complejidad en mantener las propiedades fisicoquímicas inalteradas después de haber pasado por un proceso de liofilización, lo que limita el uso experimental y el desarrollo de medicamentos (145,151). Aunque con más tiempo e investigación, las vacunas contra la COVID-19 podrían haber sido liofilizadas (193) para facilitar su almacenamiento y transporte, la urgencia acelerada en su desarrollo llevó a la fabricación de suspensiones líquidas que requieren de condiciones de almacenamiento extremadamente frías ($-20\text{ }^\circ\text{C}$ y $-80\text{ }^\circ\text{C}$) para evitar la

agregación y/o fusión de partículas, limitando su transporte y almacenamiento a largo plazo (151).

A pesar de haber determinado la T_g de las diferentes PEG-cSLNs, haber utilizado una solución de trehalosa para proteger las nanopartículas, y de no observar ningún problema tecnológico durante el proceso, la liofilización tuvo un impacto significativo en sus propiedades fisicoquímicas. Específicamente, se observó un aumento considerable en el tamaño de partícula (entre 250–300 nm) y en el PDI (>0.2) en comparación con las PEG-cSLN suspendidas en medio acuoso sin liofilizar. Al resuspender las nanopartículas, se evidenció a simple vista la presencia de agregados de tamaño centenar de micrómetros. Para mitigar la polidispersidad y reducir el tamaño de las nanopartículas, se filtraron (43–48 μm) todas las formulaciones de PEG-cSLNs, lo que resultó en poblaciones monodispersas ($\text{PDI} \leq 0.2$) con tamaños entre 200–270 nm.

Pese a que los análisis estadísticos revelaron diferencias significativas en el tamaño de partícula al comparar las PEG-cSLNs liofilizadas filtradas y sin filtrar con las suspendidas sin liofilizar, se pudo mantener la monodispersidad y se observó un aumento en la carga superficial después de la liofilización y la filtración. Este aumento contribuye a mitigar, en cierta medida, el efecto de la PEGilación que inicialmente reducía el área superficial de las nanopartículas.

Para proseguir con los ensayos biológicos de toxicidad, formación de complejos y transfección celular, se realizaron análisis morfológicos de la estructura coloidal (194), tanto de las PEG-cSLNs liofilizadas filtradas como de las PEG-cSLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar. Estos análisis aportan detalles sobre la forma de las diferentes PEG-cSLN analizadas, así como también determinan la presencia/ausencia de cualquier agregación y/o fusión que puede presentarse en el medio (189). Los resultados no revelaron la presencia de estructuras amorfas en ninguno de los estados evaluados. De hecho, en todas las formulaciones se observaron nanopartículas esféricas bien definidas con una matriz sólida, lo que sugiere que la liofilización no alteró significativamente la forma de las PEG-cSLNs. Es elemental señalar que la forma más comúnmente utilizada en el diseño de vehículos de transporte de fármacos son esferas. Sin embargo, partículas con formas parecidas a “gusanos”, como elipsoidales, cilíndricas y discoidales, o filomicelas, pueden lograr una mejor acumulación dentro de los tumores (106).

Además, se observó una diferencia notable en la morfología entre las formulaciones, lo que indica que cada excipiente PEGilado influye de manera única en las características

fisicoquímicas de las nanopartículas. Junto con el tamaño de partícula, el Pdl y el ZP, la forma se considera un factor determinante y crucial en el desarrollo de nanopartículas, ya que incide en su comportamiento en distintos procesos biológicos, como la circulación sanguínea, la especialización (*targeting*), la captación celular y el tráfico intracelular (139). La interacción entre la forma de las nanopartículas y la especificidad celular es crítica para la captación celular, dado que la forma también influye en las respuestas biológicas y potencia el direccionamiento de nanopartículas recubiertas de anticuerpos al endotelio (192).

Estos resultados sugieren que el método de filtración podría ser una alternativa viable para evaluar las propiedades biológicas de las cinco formulaciones con diferentes PEGs. De hecho, se evaluaron las características biológicas de las PEG-cSLNs liofilizadas filtradas, cuyos resultados se discuten en los siguientes párrafos. Adicionalmente, estos hallazgos fueron publicados como parte del primer capítulo de la tesis, donde se compararon las propiedades fisicoquímicas y biológicas entre las PEG-cSLN liofilizadas y las sin liofilizar.

Por otro lado, se examinó otro aspecto crucial en esta tesis doctoral: el estudio y optimización del proceso de liofilización para la producción de formulaciones liofilizadas de PEG-cSLNs. Se observó que el ciclo convencional de liofilización impactó significativamente las características fisicoquímicas de las PEG-cSLNs. El ajuste de los ciclos de liofilización son factores determinantes para poder establecer las condiciones de almacenaje que sirvan para conservar las nanopartículas de manera estable en el tiempo y que la estructura de éstas no se deteriore pasado este tiempo. El resultado de la liofilización depende de varios factores como la temperatura y la presión alcanzado en los ciclos y su duración (158). Por esta razón, se debe conocer muy bien cada etapa de este método que tiene como objetivo final la estabilización a largo plazo de las nanopartículas, así como también aumentar su vida útil. Una selección apropiada de los parámetros operativos, como la velocidad de congelación y concentración de partículas en la suspensión antes de la liofilización, juega un papel fundamental en la protección de las partículas contra el estrés ocasionado por el proceso (145).

Sin embargo, las variaciones de los parámetros del proceso de liofilización casi siempre son enfocadas a las velocidades de congelación o a los cambios de crioprotectores con diferentes concentraciones, por lo que, todavía no está del todo claro en que consiste el mecanismo de la velocidad de congelación siendo un factor determinante para el producto final (186). Se ha visto que las velocidades de congelación son de importancia menor con respecto a la composición de la formulación, pues se asume que la

combinación de la formulación tiene un gran impacto en la estabilidad de las nanopartículas después de la liofilización, por lo que la mayoría de estudios han reportado que el proceso de liofilización se ha utilizado como una herramienta para preparar formulaciones estables (145,151).

Como bien se conoce, la liofilización es un método alternativo para aumentar y mejorar la estabilidad y viabilidad de las nanopartículas, puesto que estos sistemas coloidales tienen una pobre estabilidad. Para estabilizar los sistemas coloidales inestables y evitar que el proceso de degradación química se acelere, es fundamental remover el agua, pues así, el movimiento Browniano de las nanopartículas queda restringido, reduciendo la posibilidad de la agregación de éstas. Paradójicamente, este proceso induce a la aglomeración de las nanopartículas debido al irrevocable estrés ejercido por el proceso de congelación y de secado, lo que resulta en un aumento medible en el tamaño de las partículas, comprometiendo sus características fisicoquímicas y pudiendo dañar los compuestos lipídicos (145,151,185,186,195). De hecho, en la mayoría de los estudios, el proceso de liofilización es conducido con un solo tipo de nanopartícula, lo que proporciona información limitada de las reglas generales para liofilizar sistemas coloidales, que de por sí, ya tienen una tendencia espontánea para agregarse. Por lo que, diferentes tipos de nanopartículas se enfrentan a distintos retos que pueden afectar su estabilidad durante el proceso de liofilización (145,151).

Está bien documentado que el paso de congelación es considerado como el paso más agresivo de la liofilización, sobre todo en los estudios de congelación y descongelación (*Freeze-thaw*), donde la formación de cristales de hielo ejerce un estrés mecánico sobre las moléculas, aumentando el riesgo de aglomeración y/o coalescencia (145,151,160). Asimismo, se ha reportado que el tamaño de los cristales y la capa de estabilización del surfactante puede afectar el flujo de vapor de agua durante el secado primario, lo que afectaría al producto final seco. Para evitar esta crio concentración se hace uso de crioprotectores (disacáridos amorfos), que protegen y ayudan a estabilizar las nanopartículas contra el estrés de la congelación y del secado, reduciendo la agregación, acortando el tiempo de reconstitución y disminuyendo la humedad residual (145,151,158,186). Así, con el objetivo de solucionar el impacto negativo del proceso de liofilización en todas las formulaciones de PEG-SLNs desarrolladas, se realizaron estudios detallados para ajustar rampas de temperatura, vacío y duración del proceso, parámetros cruciales para garantizar la sublimación de la solución y lograr con éxito el proceso de liofilización, lo que permite mantener estable la distribución del tamaño de partícula (PSD).

Basándose en una revisión bibliográfica, se realizó un exhaustivo estudio para establecer los parámetros adecuados para un proceso de liofilización efectivo. De entre las cinco formulaciones PEGiladas evaluadas previamente, se seleccionaron tres PEGs: DSPE y los Myrj 52 y S100, debido a su adecuado rendimiento fisicoquímico, para continuar con el estudio más profundo del proceso de liofilización. Además, se decidió reemplazar el PEG Gelucire por Tefose 63 y 1500, a pesar de haber obtenido resultados adecuados correspondiente a sus propiedades fisicoquímicas. Esta decisión se basó en el hecho de que Gelucire tiene un HLB más hidrófilo (13), mientras que los nuevos PEGs tienen un HLB menor, lo que los hace más lipófilos y especialmente adecuados para emulsiones o/w.

Así, se realizaron ensayos empleando rampas de temperatura y duración del proceso de forma escalonada, con un vacío de 0.3 mbar, lo que resultó en un mínimo incremento del tamaño de partícula, indicando una baja aglomeración de las nanopartículas. No obstante, aún fue necesario filtrar las PEG-cSLNs liofilizadas para eliminar los excesos de aglomerados. Se observó que el estrés provocado por el proceso de liofilización afectó en menor medida las propiedades fisicoquímicas cuando se emplearon rampas de temperatura y duración del proceso, en comparación con las PEG-cSLNs liofilizadas con una receta convencional. Las modificaciones propuestas de los parámetros del proceso de liofilización cumplieron con los objetivos deseados, y las condiciones de las rampas #2 y #3 (Anexo IV) resultaron ser las óptimas. Sin embargo, se observó que el tamaño de partícula todavía era ligeramente mayor utilizando rampas de temperatura y duración del proceso, lo que sugiere la necesidad de investigar el efecto de otros parámetros adicionales.

Por lo tanto, una vez que se establecieron los parámetros temperatura y duración del proceso, se llevaron a cabo liofilizaciones utilizando estas rampas, pero variando los niveles de vacío (0.1–0.4 mbar) para determinar su efecto en el tamaño de partícula resultante de las PEG-SLNs. Se observó que el grado de vacío afectaba también a los parámetros de PSD y Pdl. Sorprendentemente, se describió que el vacío más adecuado resultó ser el mismo que se utilizó inicialmente (0.3 mbar). Aun así, como se ha comentado anteriormente, todavía se observaba un ligero aumento del tamaño de partícula, por lo que a continuación se investigó el efecto de los crioprotectores.

De esta manera, con estos parámetros establecidos, se realizaron ensayos para determinar si la trehalosa al 5 % era el crioprotector más adecuado para mantener las propiedades fisicoquímicas de las PEG-cSLNs. La hipótesis inicial era que,

efectivamente, la trehalosa debía ser el mejor crioprotector, ya que las CO-SLNs de partida que se desarrollaron en tesis previas así lo demostraron. Se evaluaron tres agentes de carga diferentes: trehalosa, sucralosa y sacarosa, y sorprendentemente, la sacarosa demostró ser el crioprotector más efectivo para las PEG-cSLNs, coincidiendo con su uso común como crioprotector en varios estudios (145,151,158,160,183,196). Después de establecer la sacarosa como el crioprotector más adecuado, se determinó la concentración más apropiada para preservar las características fisicoquímicas de las PEG-cSLNs, evaluando concentraciones desde 5% hasta 30%. Se encontró que una concentración del 20% de sacarosa era la más idónea para este propósito.

Un agente de carga es una sustancia que se añade a una formulación y se utiliza durante el proceso de liofilización para proteger los componentes biológicos o bioquímicos de los efectos dañinos del congelamiento y la deshidratación durante el proceso. La liofilización mejora la estabilidad y la eficiencia del secado de productos farmacéuticos, biotecnológicos o alimenticios. Los agentes de carga pueden ser sustancias inertes, como azúcares (como la sacarosa o el manitol), polímeros (como el dextrano), o proteínas (como la albúmina de suero bovino), que se añaden a la formulación del producto antes del proceso de liofilización. Su función es mantener la estructura y la integridad del producto durante el proceso de congelación y secado, proporcionando estabilidad a largo plazo a los productos liofilizados. Además, actúan como crioprotectores al minimizar la formación de cristales de hielo que podrían dañar las estructuras fisicoquímicas o biológicas durante el proceso de congelación y descongelación (145,155,195).

Estos agentes ayudan a reducir la agregación de las partículas, acortando el tiempo de reconstitución y disminuyendo la humedad residual (145,160). Además, de estas propiedades, también forman una estable y amorfa matriz vítrea (hipótesis de vitrificación) que interactúa con la superficie de las nanopartículas, incorporándolas e inmovilizándolas, previniendo de esta manera la fusión o agregación de éstas (150,156). En este sentido, los crioprotectores pueden separar las PEG-cSLNs individualmente, evitando así, que las fuerzas de Van der Waals sean mayores que las fuerzas de repulsión (151).

No obstante, el efecto de vitrificación por sí solo no es suficiente para preservar la integridad de las nanopartículas, ya que las propiedades fisicoquímicas se ven influenciadas por la PEGilación, como se detalló anteriormente. Se ha reportado que lípidos PEGilados con largas cadenas de PEG (MW5000) y un andamio lipídico más corto (dimiristoil glicerol), exhibieron mejores habilidades crioprotectoras (DMG-

PEG5000) (160). En este contexto, cSLNs con largas cadenas de PEG (DSPE y Myrij S100) tuvieron tamaños de partícula similares a aquellas nanopartículas sin PEG (CO-cSLNs). Esto puede ser causado por el efecto crioprotector que provoca el PEG.

Existen diversas hipótesis que pueden explicar el posible mecanismo de protección que utilizan los crioprotectores para preservar las características fisicoquímicas de las nanopartículas durante el proceso de liofilización. Entre estas hipótesis se encuentran la de vitrificación, de aislamiento y de reemplazo de agua. La primera se basa en la formación de una matriz vítrea cuando la temperatura desciende por debajo de T_g (145,151). Los lioprotectores o crioprotectores, detallados en la sección 4.1.4.4, tienen la capacidad de formar una matriz vítrea amorfa estable que interactúa con la superficie de las nanopartículas y las inmoviliza. La diferencia entre los lio y crioprotectores, radica en que los primeros protegen a las partículas durante el secado primario y secundario, mientras que los segundos las protegen durante la congelación del producto. La mayoría de los disacáridos empleados para crioprotección cumplen con ambas funciones, asegurando la protección de las nanopartículas tanto durante la congelación como durante los secados a lo largo del proceso de liofilización (156). Los crioprotectores utilizados en todas las liofilizaciones realizadas cumplirían con estas condiciones.

La segunda hipótesis sugiere que se puede evitar la agregación aumentando el volumen del concentrado congelado, diluyendo así las partículas. Si hay suficientes moléculas estabilizadoras presentes en el medio para separar las PEG-cSLNs en la fracción descongelada, no sería necesario formar cristales azucarados ni alcanzar una temperatura de congelación por debajo de T_g para evitar la agregación de las nanopartículas (145,151). Se conoce que la concentración de la suspensión a ser liofilizada puede influir en la agregación de partículas, puesto que, si aumenta la concentración puede aumentar las interacciones entre las partículas, lo que resultaría menos vacío y posibles aglomeraciones, aumentando así los valores de densidad (186). Por último, la hipótesis de reemplazo de agua sugiere que, durante el secado, la lioprotección se debe a la formación de puentes de hidrógeno entre el lioprotector y el grupo polar en la superficie de las nanopartículas. A medida que el agua se remueve de la suspensión durante el secado, los lioprotectores actúan reemplazando las moléculas de agua (151).

Estos agentes afectan de manera diferencial varios atributos de estabilidad y calidad de las nanopartículas liofilizadas, ya que no solo previenen la agregación de éstas durante la congelación, sino también las mantienen separadas durante el secado (151). Además, tienen la capacidad de aumentar la viscosidad y el volumen de la fase descongelada,

reduciendo así, la probabilidad de interacción de las partículas, minimizando el contacto estrecho de los lípidos. De esta manera se puede lograr una estabilización coloidal durante la congelación y el secado, manteniendo la calidad de las nanopartículas a lo largo de todo el proceso de liofilización, evitando que éstas se agreguen significativamente, y preservando la distribución original del tamaño de las nanopartículas (145,151,195).

A pesar de haber establecido las rampas de temperatura y duración del proceso, con un vacío determinado para la liofilización y el crioprotector adecuado con su concentración óptima, aún persistía la presencia de aglomerados, aunque en menor medida en comparación con las PEG-cSLNs liofilizadas sin la optimización inicial del proceso. Por ello, se procedió a realizar una segunda optimización del proceso de liofilización mediante la aplicación de seis rampas de temperatura diferentes, modificando parámetros como la temperatura y la duración del proceso tanto en el secado primario como en el secundario. Se determinó que las rampas #3 y #4 fueron las más adecuadas para llevar a cabo un proceso de liofilización exitoso, cuyas condiciones se detallan en el Anexo IV; Figura S1. La diferencia radicó en que en la primera se evaluaron las condiciones de temperatura y duración del proceso en el secado secundario, mientras que en la segunda se realizaron estas evaluaciones en el secado primario, disminuyendo el estrés ejercido por el proceso de liofilización.

La liofilización, un paso crucial en la producción de formulaciones liofilizadas de SLNs, garantiza la estabilidad de los productos durante su almacenamiento y distribución a largo plazo. Así, un estudio completo y la optimización de este proceso son fundamentales para preservar las características fisicoquímicas de las PEG-SLNs, asegurando su eficacia terapéutica y evitando que su integridad se vea comprometida por el estrés inducido durante la liofilización. Se ha identificado que el estrés generado por la liofilización puede tener un impacto significativo en las características fisicoquímicas de las nanopartículas (145,156). Estrategias como el control preciso de la temperatura, vacío y duración del proceso, junto con la selección apropiada de crioprotectores con su concentración adecuada, son fundamentales para obtener productos liofilizados de alta calidad que conserven la estabilidad y la eficacia terapéutica de las SLNs.

De esta manera, mediante el empleo de rampas de temperatura, con un vacío determinado, con una duración de tiempo adecuado y con una selección y concentración apropiada de crioprotectores se ha logrado mantener estables a las PEG-cSLNs después de haber sometido a la solución coloidal al proceso de liofilización. Es

fundamental el estudio y optimización de un adecuado proceso, tal como describe la ICHQ8 sobre *Quality by Design* (QbD), para que, de esta manera, el producto final se mantenga dentro de los altos estándares de calidad. Todavía se puede mejorar el proceso de liofilización mediante la determinación de la concentración de nanopartículas y también establecer concentraciones adecuadas de tensoactivos, de esta manera, la estabilidad de las PEG-cSLNs se podría todavía potenciar más.

Después del estudio y la optimización del proceso de liofilización, esta tesis se enfocó en reducir el tamaño de partícula de las formulaciones aún más, objetivo inicial que se logró levemente al modificar el protocolo de fabricación de las PEG-cSLNs. Además de los métodos físicos empleados, se aplicaron métodos químicos para modificar la matriz de las PEG-cSLNs con cistamina. Se siguió el mismo procedimiento utilizado para determinar la cantidad apropiada de PEG a incorporar en la superficie de las nanopartículas, pero esta vez se aplicó a la cistamina, estableciendo que 150 mg fue la cantidad óptima para fabricar PEG-cSLNs de menor tamaño. La formulación final consistió en 98 mg de ácido esteárico, 147 mg de colesteril oleato, 105 mg de PEG y 150 mg de cistamina.

Las modificaciones en la matriz se produjeron debido a la interacción de los grupos amino terminales del enlace disulfuro de la cistamina con el grupo carboxilo del ácido esteárico, lo que resultó en su incorporación en la matriz de las PEG-cSLNs y en una reducción del tamaño de partícula. La aplicación simultánea de ambos mecanismos, físicos y químicos, durante la fabricación de las PEG-cSLN, demostró reducciones significativas en el tamaño de partícula. Los polímeros que contienen enlaces disulfuro y que actúan como nanoportadores son los más investigados, ya que poseen propiedades de reducción. No obstante, otros grupos como el seleniuro y el diseleniuro también se han utilizado para el mismo propósito. Estos sistemas de reducción se han diseñado utilizando principalmente dos estrategias diferentes: la inserción de un enlace disulfuro en las cadenas principales del polímero o el uso de moléculas entrecruzadas sensibles a la reducción que pueden incorporarse en el núcleo o la cubierta de los nanoportadores apropiados. Algunos de los precursores más comúnmente utilizados para desarrollar estructuras poliméricas que contengan enlaces disulfuro son la cistina y la cistamina (197).

Al comparar los tamaños de partícula entre las PEG-cSLNs (DSPE, Myrj 52, Tefose 63 y 1500) con y sin cistamina, utilizando el protocolo modificado, se observó una disminución aún más evidente en el tamaño de partícula en comparación con las nanopartículas que carecían de cistamina en su matriz. Como resultado, se obtuvieron

nanopartículas con tamaños comprendidos entre 120 y 130 nm, en contraste con los 180 y 200 nm que presentaban las nanopartículas sin cistamina. Incluso, las CO-cSLNs con cistamina presentaron una disminución significativa en el tamaño de partícula (~150 nm) en comparación con aquellas que no contenían cistamina (~200 nm).

Es relevante resaltar la importancia del tamaño de partícula, dado que estudios previos han indicado que las nanopartículas cercanas a los 100 nm son ideales para lograr una transfección celular eficiente. Partículas que superan este tamaño encuentran mayores dificultades para ingresar en las células o atravesar las barreras biológicas del organismo, lo que también influye en su comportamiento *in vivo*. Por tanto, las partículas con un tamaño inferior a 100 nm tienen una mayor capacidad de ingresar en las células y son consideradas como candidatas ideales para lograr una transfección celular exitosa (139,187). De hecho, se ha reportado que la receta estándar para desarrollar sistemas coloidales con fines terapéuticos implica el uso de partículas de tamaño reducido (por debajo de 100 nm) con estabilización estérica como resultado de la PEGilación (191).

Nanopartículas con un rango de tamaño entre 100–150 nm, les cuesta salir de los capilares que perfunden tejidos como el riñón, el pulmón y el corazón. Mientras que partículas pequeñas con rango de tamaño entre 20–100 nm pueden ser distribuidas hasta la médula ósea, el bazo y los sinusoides hepáticas (189). Por tanto, mientras más pequeña es la partícula, mejor el rendimiento de absorción de ésta. Por consiguiente, se ha observado que las nanopartículas de tamaños alrededor de 100 nm han exhibido una vida media en circulación mejorada en comparación con partículas más pequeñas o más grandes (192). Por estas razones es imperativo realizar diversos procesos que estén al alcance para poder reducir las PEG-cSLNs a tamaños cercanos a los 100 nm.

Inclusive, si la nanopartícula es muy grande, no será capaz de pasar a través del denso fluido intersticial de la matriz extracelular generado por las células tumorales y alcanzar a las células objetivo a tratar, puesto que la difusión es limitada por el tamaño. Por ejemplo, para tomar ventaja de la alta permeabilidad de los vasos sanguíneos tumorales debido al efecto mejorado de permeabilidad y retención (EPR), el cual permite la absorción de compuestos macromoleculares dentro del tejido tumoral durante un período prolongado. El tamaño de las partículas y otras propiedades fisicoquímicas, como la carga superficial y la configuración espacial, son determinantes para que un fármaco alcance el efecto EPR (106,192).

A pesar de que se ha reportado que el tamaño de los poros en las vasculaturas tumorales con fugas es de entre 380 a 780 nm (192), el rango de tamaño de partícula

óptimo considerado para lograr el efecto EPR en tumores sólidos y escapar de las trampas de filtración del hígado y el bazo se encuentran en el rango de 100 ~ 200 nm (106). Sin embargo, se debe considerar que las partículas menores a 10 nm sufren filtración renal y se eliminan fácilmente del cuerpo, por lo que no serán reabsorbidas debido a que el tamaño es un parámetro importante en el diseño de nanopartículas de larga circulación (139,189).

Con la incorporación de cistamina, se procedió a liofilizar las nanopartículas utilizando cuatro tipos de PEGilados diferentes (Myrj 52, Tefose 63, Tefose 1500 y DSPE), con el fin de continuar con la caracterización estructural y los ensayos biológicos. Lamentablemente, todas las PEG-cSLNs con cistamina sufrieron un alto grado de estrés durante el proceso de liofilización, a pesar de determinar la temperatura de transición vítrea (T_g) y aplicar un ciclo optimizado de liofilización. Esto evidencia que cualquier modificación realizada en las SLNs afectará sus características fisicoquímicas, especialmente en estas nanopartículas en particular.

Es relevante subrayar que al liofilizar las PEG-cSLNs con cistamina utilizando una receta optimizada, se observó una menor afectación en sus características fisicoquímicas en comparación con aquellas liofilizadas con una receta convencional. Este hallazgo sugiere la necesidad de estudiar y optimizar un nuevo proceso de liofilización debido a la adición de un nuevo excipiente a la formulación, lo cual generó resultados similares a los observados al incorporar PEG en la superficie de las nanopartículas. Además, se evidenció que un proceso optimizado potencialmente protegería de manera más eficiente a las PEG-cSLNs, manteniendo sus propiedades fisicoquímicas lo menos alteradas posible.

En relación con los estudios de estabilidad, se observó que tanto las PEG-cSLNs como las CO-cSLNs sin liofilizar presentaron una mayor estabilidad a una temperatura de 4 °C en comparación con 25 °C. Sin embargo, se evidenció que las PEG-cSLNs exhibieron una mayor estabilidad a lo largo del tiempo en comparación con las CO-cSLNs. Las PEG-cSLNs mantuvieron poblaciones monodispersas ($PDI < 0.2$) durante más de un mes, mientras que las CO-cSLNs mostraron una disminución en su estabilidad después de 15 días. Este fenómeno se atribuye principalmente a la estabilización estérica proporcionada por el PEG en la superficie de las nanopartículas, lo cual genera una barrera que impide su aglomeración, generando formulaciones con una mayor estabilidad durante la producción, el almacenamiento, y la aplicación que se vaya a llevar a cabo (127,140).

La PEGilación claramente mejora la estabilidad de las CO-cSLNs en suspensión acuosa, duplicando su periodo de estabilidad en comparación con las nanopartículas sin PEGilación. Aunque la temperatura puede ser un factor limitante, especialmente considerando la necesidad de almacenar medicamentos a temperatura ambiente, se encontró que a una temperatura de 4 °C resulta adecuada para almacenar estas nanopartículas. Este hallazgo es relevante, ya que incrementar el *holding time* antes del proceso de liofilización facilitaría la fabricación a nivel industrial.

Adicionalmente, la carga superficial puede mejorar la estabilización debido a las fuerzas de repulsión electrostática que existe entre las nanopartículas (156,198). El lípido catiónico está compuesto por aminas cuyos átomos de nitrógeno se protonan cuando son expuestos a un medio acuoso, cargando catiónicamente (positivamente) la superficie de la nanopartícula (109). Por tanto, el aumento del potencial zeta provee una mayor estabilidad dado al incremento de la repulsión electrostática (198). Adicionalmente, la carga superficial puede mejorar la estabilización debido a las fuerzas de repulsión electrostática que existe entre las nanopartículas (156,198). El lípido catiónico está compuesto por aminas cuyos átomos de nitrógeno se protonan cuando son expuestos a un medio acuoso, cargando catiónicamente (positivamente) la superficie de la nanopartícula (109). Por tanto, el aumento del potencial zeta provee una mayor estabilidad dado al incremento de la repulsión electrostática (198).

Estos dos factores desempeñaron un papel crucial y relevante en la mejora de la estabilidad general de las PEG-cSLNs (151). No obstante, las nanopartículas son más susceptibles a cambios en la estabilidad que los microsistemas a causa de que poseen una mayor área superficial específica (189,198). El aumento del área superficial conlleva a que las nanopartículas sean más propensas a la aglomeración, convirtiéndose en un importante inconveniente en comparación con otros sistemas de administración de medicamentos a microescala (189,198). Sin embargo, a pesar de la agregación irreversible de las nanopartículas causada por las fuerzas de Van der Waals (151), se logró obtener una estabilidad satisfactoria de estas nanopartículas a 4 °C.

Por otro lado, la liofilización de las PEG-cSLNs, con su mayor estabilidad en comparación con las CO-cSLNs, extiende aún más su estabilidad a lo largo del tiempo. Los resultados de los estudios de estabilidad de las PEG-cSLNs liofilizadas reflejaron una mayor estabilidad cuando se almacenaron a 4 °C en comparación con 25 °C durante un mínimo de un año, lo que confirma la mejora sustancial en la estabilidad lograda mediante la liofilización. Aunque las formulaciones de nanopartículas liofilizadas no están aún disponibles en el mercado y las vacunas contra la COVID-19 requieren de

condiciones de almacenamiento extremadamente bajas para evitar la aglomeración de las nanopartículas al estar en un medio acuoso, estas formulaciones surgen como una opción potencialmente viable a escala industrial. Esto es relevante dada la creciente demanda de medicamentos biológicos que requieren condiciones de almacenamiento tan bajas como -20 °C o incluso -80 °C debido a su baja estabilidad y susceptibilidad a la degradación a temperatura ambiente. No obstante, el almacenamiento a 4 °C no representaría un problema significativo, ya que bastaría con una nevera a esta temperatura para conservar estos medicamentos basados en nanopartículas de manera efectiva, puesto que dichas neveras son comunes tanto en los hospitales como en domicilios particulares.

Igualmente, se realizaron estudios de estabilidad de las PEG-cSLNs con cistamina, revelando un comportamiento similar al mencionado anteriormente, donde las nanopartículas mantuvieron una mayor estabilidad a 4 °C en comparación con 25 °C durante más de un mes. Sin embargo, todas las PEG-cSLNs con cistamina liofilizadas colapsaron y se aglomeraron, destruyendo las nanoestructuras. Esto sugiere que, al introducir un nuevo excipiente a la formulación, como ocurrió con el PEG, se producen cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas, especialmente si este excipiente afecta directamente una de ellas, como en este caso, el tamaño de partícula. Esto resalta la necesidad de estudiar y optimizar un nuevo proceso de liofilización para preservar las propiedades fisicoquímicas originales y obtener nanopartículas con tamaños y dispersión adecuados para la transfección celular. Finalmente, se evidenció que en cualquier desarrollo galénico donde se cambie un solo excipiente puede implicar volver a empezar los estudios de proceso y/o de estabilidad, hecho que resalta la importancia de la aplicación de la ICHQ8 en el desarrollo de medicamentos.

Todos los resultados mencionados anteriormente se refieren a la caracterización galénica de las PEG-cSLNs. En cuanto a la caracterización biológica llevada a cabo en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (IPBLN) de Granada, se obtuvieron resultados destacables con las cinco formulaciones evaluadas (Brij S100, DSPE, Gelucire, Myrj 52 y Myrj S100). Las PEG-cSLNs, tanto liofilizadas como suspendidas en medio acuoso sin liofilizar, no mostraron toxicidad para las células HEK293T con volúmenes entre 5–10 µL de nanopartículas, aunque volúmenes superiores a 15–20 µL presentaron efectos tóxicos para las células. Es relevante subrayar que el tratamiento de las células con las PEG-cSLNs genera cierto estrés, lo que puede conllevar a una disminución del metabolismo celular (90).

Las formulaciones DSPE, Gelucire y Mirj S100 demostraron ser posibles candidatos para la transfección celular al emplear 10 μ L de PEG-cSLNs, mientras que Brij S100 y Myrj 52, con el mismo volumen, resultaron tóxicas. El PEG DSPE fue el único que no mostró toxicidad, ya sea en estado liofilizado o en suspensión sin liofilizar, al emplear un volumen de 10 μ L; todas las demás formulaciones con nanopartículas suspendidas sin liofilizar mostraron toxicidad a partir de este volumen. Además, todas las formulaciones liofilizadas, incluida aquella que no contiene PEG (CO-SLN), presentaron menor toxicidad que las nanopartículas suspendidas en medio acuoso sin liofilizar. Esto podría estar relacionado con la filtración de aglomerados que se realiza una vez resuspendidas las nanopartículas, dando lugar a una suspensión menos concentrada que la inicial.

Estos resultados cualitativos fueron respaldados cuantitativamente mediante la tinción con yoduro de propidio y la evaluación por citometría de flujo. Efectivamente, se demostró que al agregar un volumen de 20 μ L o más de PEG-SLNs, la viabilidad celular disminuyó aproximadamente un 65% en comparación con las células no tratadas después del tiempo de incubación. De manera similar, se confirmó que, a volúmenes de 10 μ L, en todas las formulaciones y, aparentemente, en ambos estados (PEG-cSLNs suspendidas sin liofilizar y liofilizadas), las PEG-cSLNs mostraron una alta viabilidad celular, como se evidenció por la ausencia de toxicidad en las células HEK293T mediante el ensayo con yoduro de propidio. En casi todas las formulaciones evaluadas con este volumen, la viabilidad celular superó el 90%.

Estos hallazgos sugieren que, bajo condiciones experimentales específicas, las PEG-cSLNs no generan efectos dañinos en cultivos *in vitro* con células humanas. Es relevante señalar que, en el ensayo con yoduro de propidio, el Myrj S100 parece distinguirse como la formulación más prometedora, al mostrar una viabilidad celular superior al 90% en ambos estados y volúmenes evaluados. Estos resultados indican la ausencia de efectos citotóxicos de las SLNs en células humanas, lo que sugiere una indicación favorable para continuar con la formación de complejos con material genético en un volumen específico. En biología molecular, se considera que un tratamiento es biocompatible si no se observa una mortalidad del 20%, es decir, si existe una supervivencia del 80% (90). El grupo de investigación de este trabajo considera que este valor es un tanto elevado y siempre se busca minimizar la toxicidad. Aun así, los resultados observados muestran alrededor de un 10% de mortalidad, lo que confirma que la formulación es totalmente biocompatible.

En relación con los ensayos de viabilidad/citotoxicidad celular utilizando las SLNs con cistamina, tanto PEGiladas como sin PEGilar, todas las formulaciones resultaron ser tóxicas para las células cuando se administraron volúmenes superiores a 5 μL , exhibiendo una menor viabilidad en comparación con las PEG-cSLNs sin cistamina. Este efecto se atribuye a que los ensayos biológicos se realizaron con SLNs suspendidas en medio acuoso sin liofilizar, ya que la liofilización provocó una aglomeración irreversible de estas nanopartículas. Como era de esperar, las PEG-cSLNs con cistamina resultaron altamente tóxicas para las células, dado que están diluidas en un bajo porcentaje de etanol (199,200). Por lo tanto, para mejorar el rendimiento de estas nanopartículas, se sugiere considerar realizar un nuevo estudio y optimización del proceso de liofilización, como se mencionó previamente, o explorar otras alternativas para eliminar el etanol sin inducir la cristalización entre la cistamina y el ácido esteárico. Una posible alternativa podría ser eliminar el etanol mediante diálisis en caso de que las nanopartículas no puedan ser liofilizadas.

Una vez determinado que un volumen de 10 μL de PEG-cSLNs no es tóxico para las células, se procedió a evaluar la eficiencia de carga estableciendo la cantidad de material genético a incorporar. Esto se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa, en los cuales se comparó el ADN desnudo (control) con aquel que se encontraba con las SLNs, reteniendo su movilidad electroforética a pesar de la presencia de una corriente eléctrica.

Se observó que las PEG-cSLNs no pudieron formar suficientes complejos cuando la cantidad de material genético superó los 2 μg , detectándose la movilidad de ADN libre en los geles a causa de la corriente eléctrica, lo que demostró que las SLNs desarrolladas no son capaces de complejar cantidades superiores a esta. Sin embargo, cabe resaltar que cantidades superiores tampoco son necesarias, ya que varios experimentos previos del grupo de investigación han demostrado que la cantidad óptima para transfectar plásmidos es de 750–1200 ng.

No obstante, tanto las PEG-cSLNs suspendidas como liofilizadas formaron SLNplejos cuando la cantidad de ADN plasmídico estuvo entre 0.5 y 1.0 μg , confirmando así su idoneidad para unir material genético con las SLNs en ambos estados (liofilizados y en suspensión). Esto se logró a pesar de la PEGilación, que reduce la carga superficial (ZP) y podría afectar la unión entre las nanopartículas y el ADN. Además, se observó un notable aumento en el potencial Z después del proceso de liofilización.

Por otro lado, la eficiencia de carga de las SLNs con cistamina, tanto PEGiladas como sin PEGilar, también fue evaluada y se obtuvieron resultados similares a los mencionados anteriormente. Los complejos se formaron utilizando cantidades entre 0.5 y 1.0 μg de ADN plasmídico, incluso con un volumen mínimo de 2 μL de PEG-cSLNs. Al igual que las SLNs sin cistamina, no se pudieron formar complejos con cantidades de ADN plasmídico superiores a los 2 μg . Ni la PEGilación ni la incorporación de cistamina en la formulación afectaron la carga superficial de las nanopartículas, lo cual coincide con los potenciales Z determinados en la caracterización galénica.

Por último, tras establecer el volumen óptimo de PEG-cSLNs (10 μL) para la formación de complejos con material genético, se realizaron ensayos para determinar la eficiencia de transfección en células HEK293T, incorporando el plásmido MHC mediante las PEG-cSLNs. En comparación con el control positivo (Lipofectamina), se observó un número significativamente bajo de células transfectadas en todas las formulaciones desarrolladas, incluyendo las SLNs sin PEG (CO). Además, se observó una transfección considerablemente menor al utilizar PEG-cSLNs en comparación con CO-cSLNs, lo que sugiere que tanto la adición de un nuevo excipiente en la formulación base como el estrés inducido por el proceso de liofilización alteran las propiedades fisicoquímicas originales de las SLNs, ocasionando una alta inestabilidad fisicoquímica. Cabe hacer hincapié en que todos los experimentos biológicos se realizaron con anterioridad a la optimización del proceso de liofilización, por lo que se carecen de resultados biológicos de las nanopartículas después de dicha optimización.

Por ende, mantener las características fisicoquímicas de las nanopartículas podría potencialmente mejorar los resultados de transfección celular. Un proceso de liofilización optimizado, que no someta a un estrés significativo a las PEG-cSLNs y que mantenga adecuadamente sus propiedades fisicoquímicas, podría conducir a transfecciones más efectivas. La transfección de plásmidos mediante vectores como las nanopartículas sigue siendo un desafío no resuelto de manera eficiente. Aunque existen investigaciones y grupos que han logrado la transfección de plásmidos, las eficiencias de transfección no son muy altas debido al gran tamaño de los plásmidos (5–8 kb), lo que resulta en lipoplejos de gran tamaño que no pueden ingresar eficientemente en las células.

Esta limitación dificulta la aplicación clínica de la transfección, y es necesario seguir investigando para lograr la transfección eficiente de plásmidos mediante nanopartículas fabricadas de manera escalable y económicamente viable. Dado que la liofilización ha afectado las características fisicoquímicas de las nanopartículas, se vuelve aún más

complicado lograr la transfección celular, lo que resalta la necesidad imperativa de evaluar estas PEG-cSLNs liofilizadas mediante un proceso optimizado.

Finalmente, se llevaron a cabo transfecciones en células HEK293T utilizando solo 2 μ L de PEG-cSLNs con cistamina debido a la alta citotoxicidad de estas nanopartículas. Se evidencia que todas las formulaciones con cistamina, incluyendo las CO-cSLNs, mostraron tasas de transfección muy bajas en comparación con las PEG-cSLNs sin cistamina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, donde se observa que las PEG-cSLNs con cistamina son altamente tóxicas para las células, lo que naturalmente se traduce en tasas de transfección muy reducidas. Finalmente, resulta crucial evaluar las propiedades biológicas de las PEG-cSLNs liofilizadas mediante un proceso optimizado, ya que esto podría potencialmente mejorar las tasas de transfección. Al mantener las características fisicoquímicas de las PEG-cSLNs intactas, a pesar del estrés inducido por la liofilización, es probable que se obtenga una mayor captación celular en comparación con las PEG-cSLNs liofilizadas mediante un ciclo convencional, donde los parámetros del proceso de liofilización no se han estudiado.

En resumen, los recientes avances en el campo de la terapia génica y la entrega de ADN/ARN mediante vectores no virales, como las SLNs, han ampliado considerablemente nuestras capacidades para desarrollar tratamientos más efectivos y seguros para una amplia gama de enfermedades. Esta tesis aporta resultados relevantes sobre la utilización de excipientes PEGilados, así como sobre el estudio de los parámetros y la optimización del proceso de liofilización, junto con la reducción del tamaño de partícula para maximizar su potencial terapéutico. Los hallazgos enfatizan la importancia de los excipientes PEGilados en la estabilidad de las nanopartículas, lo que abre nuevas oportunidades para el desarrollo de tratamientos más eficaces y seguros en el ámbito de la medicina molecular y la terapia génica, consolidándose como un auténtico potencial terapéutico en la entrega de ADN/ARN.

A pesar de la estabilidad fisicoquímica y galénica de la formulación, que incluye PEG-cSLNs de tamaño y morfología adecuados, junto con su biocompatibilidad observada y capacidad para formar complejos, la eficiencia de transfección sigue siendo limitada. Un siguiente paso para el grupo de investigación será repetir los experimentos con las PEG-cSLNs liofilizadas con el proceso optimizado, y ver su impacto en la respuesta biológica. Otras líneas de investigación que se pretenden seguir es la funcionalización con péptidos, anticuerpos o CPPs (*Cell Penetrating Peptide*) para lograr un alto porcentaje de transfección. Aun así, la incorporación de estos excipientes presenta desafíos

adicionales debido a sus costos elevados y la dificultad para fabricar las nanopartículas mediante un método robusto y reproducible. Además, como se ha evidenciado en esta tesis, la incorporación de nuevos excipientes modifica íntegramente las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, recalcando la necesidad de estudiar profundamente todos los procesos de fabricación y liofilización de nuevo.

La exhaustiva caracterización de una formulación permite comprender con precisión todos sus parámetros, lo que facilita su reproducibilidad. Además, posibilita que otros grupos de investigación y laboratorios puedan intentar replicar la fórmula con éxito. En la actualidad, se reconoce que uno de los principales desafíos en sistemas como nanopartículas, liposomas, micropartículas, entre otros, es garantizar la reproducibilidad entre lotes. Esto se vuelve especialmente crítico en ensayos clínicos de fase II o fase III, donde la variabilidad entre lotes puede afectar significativamente la respuesta de los pacientes, comprometiendo la validez de la formulación. Las empresas especializadas en estos sistemas, aplicados a péptidos o moléculas pequeñas, señalan que los mayores obstáculos se relacionan con la estabilidad de la formulación y su reproducibilidad. Por lo tanto, se resalta la importancia de obtener productos farmacéuticos adecuadamente liofilizados, especialmente en el caso de productos biológicos.

Es fundamental contar con un profundo conocimiento de la formulación desarrollada, ya que sin este conocimiento no se puede determinar de manera preliminar si se ha logrado una formulación que cumpla con las especificaciones establecidas por el desarrollador. En esta tesis, se ha buscado comprender en profundidad los parámetros que conforman la formulación desarrollada, así como su estabilidad, para poder avanzar en el proceso del *drug development*. Otro aspecto crucial de la tesis fue investigar la posibilidad de optimizar y mejorar el método de fabricación utilizado para fabricar las PEG-cSLNs. Después de analizar todos los resultados obtenidos, es evidente que aún queda mucho por explorar y que la investigación debe seguir avanzando. Esta tesis doctoral, que continúa el trabajo iniciado en tres tesis anteriores, ha aprovechado las oportunidades surgidas a partir de la investigación realizada por la Dra. Anna Fàbregas y continuada por el Dr. Marc Suñé, quien incorporó colesteryl oleato en la formulación. A su vez, este estudio abre nuevas posibilidades para futuras investigaciones, con el objetivo de seguir modificando y optimizando aún más el proceso de fabricación de las SLNs.

Esta tesis se suma al amplio panorama conformado por diversos grupos de investigación, todos persiguiendo un objetivo común: desarrollar medicamentos seguros, efectivos y reproducibles para mejorar la calidad de vida de los pacientes. La

terapia génica se encamina hacia una revolución farmacológica inminente, y la farmacia galénica debe adaptarse a este cambio, explorando al máximo los avances tecnológicos disponibles. Es fundamental que los profesionales en este campo sean multidisciplinarios y posean conocimientos en áreas como biología molecular e ingeniería genética. Solo a través de la colaboración entre distintas disciplinas y grupos de investigación se podrá avanzar hacia una investigación traslacional, personalizada y eficiente, con el propósito primordial de mejorar la vida de nuestros *targets*, los pacientes.

6. CONCLUSIONES

A continuación, se presentan las principales conclusiones de la tesis doctoral:

1. Se han desarrollado con éxito nuevas nanoestructuras galénicas de CO-cSLNs incorporando diferentes PEGs (DSPE-mPEG2000, Myrj S100, Tefoses 63 y 1500), con un método de fabricación sencillo y fácilmente escalable.
2. Se ha determinado con éxito el impacto de la PEGilación en las características fisicoquímicas, morfológicas y biológicas de las nanopartículas, tanto sin liofilizar como liofilizadas.
3. Se ha conseguido mejorar y optimizar el proceso de fabricación para obtener nanopartículas más pequeñas, eficaces y estables

Además, es primordial resaltar las siguientes conclusiones específicas:

1. Las proporciones óptimas de PEG, colesteryl oleato (CO) y ácido esteárico (SA) para una formulación estable y morfológicamente correcta fueron de 150:210:140.
2. Todas las PEG-cSLNs desarrolladas tienen un tamaño aproximado de 170–200 nm y una carga superficial de 20–40 mV.
3. Las PEG-cSLNs demostraron ser biocompatibles al no mostrar toxicidad celular con un volumen de 10 μ L, lo que valida la seguridad de las formulaciones probadas.
4. Las PEG-cSLNs desarrolladas pudieron formar complejos con material genético en cantidades de 1000 ng, aunque se evidenció la presencia de ADN libre a 2000 ng.
5. Los estudios de luciferasa indicaron que las PEG-cSLNs mostraron niveles de transfección bajos, incluso menores que las CO-cSLNs, debido al estrés inducido por la liofilización, lo que afectó sus propiedades fisicoquímicas esenciales para una óptima eficiencia de transfección.
6. La mejora del método de fabricación permitió reducir significativamente el tamaño de partícula mediante mecanismos físicos y químicos, como aumentar el tiempo y velocidad de ultra agitación y utilizar el excipiente cistamina (cys), logrando nanopartículas entre 120–130 nm, en una proporción de 150:105:147:98 referente cys:PEG:CO:SA.
7. Se logró estudiar y optimizar el proceso de liofilización mediante el control preciso de rampas de temperatura, vacío y duración del proceso, así como la identificación del crioprotector adecuado con su concentración óptima.
8. Las PEG-cSLNs liofilizadas (4 de 5) demostraron una mejor estabilidad en comparación con las suspendidas en medio acuoso sin liofilizar, cuando se

almacenaron a 4 °C. Además, las PEG-cSLNs mostraron mayor estabilidad que las CO-cSLNs, y las PEG-cSLNs con cistamina también presentaron una estabilidad superior a los 30 días.

9. Las formulaciones con los PEGs DSPE-mPEG2000, Myrj S100, Tefoses 63 y 1500, presentaron características fisicoquímicas y biológicas satisfactorias, consolidándose como candidatos idóneos para evaluar la eficiencia de transfección utilizando PEG-cSLN liofilizadas con un proceso optimizado de liofilización.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Collins M, Thrasher A. Gene therapy: progress and predictions [Internet]. Vol. 282, Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. The Royal Society; 2015 [cited 2024 Apr 10]. p. 20143003. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2014.3003>
2. Keeler AM, ElMallah MK, Flotte TR. Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions. Vol. 10, Clinical and Translational Science. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 242.
3. Alnasser SM. Review on mechanistic strategy of gene therapy in the treatment of disease. Vol. 769, Gene. Elsevier; 2021. p. 145246.
4. Gonçalves GAR, Paiva R de MA. Gene therapy: advances, challenges and perspectives [Internet]. Vol. 15, Einstein (Sao Paulo). Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein; 2017 [cited 2024 Apr 10]. p. 369–75. Available from: <https://www.scielo.br/j/eins/a/cPw3g6fGY8srqk5hs83dDKR/?lang=en>
5. Wilkins O, Keeler AM, Flotte TR. CAR T-cell therapy: progress and prospects [Internet]. Vol. 28, Human Gene Therapy Methods. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2017 [cited 2024 Apr 10]. p. 61–6. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hgtb.2016.153>
6. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. Science (80-) [Internet]. 1995 Oct 20 [cited 2024 Apr 11];270(5235):475–80. Available from: <https://www-science-org.sire.ub.edu/doi/10.1126/science.270.5235.475>
7. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update [Internet]. Vol. 20, Journal of Gene Medicine. John Wiley & Sons, Ltd; 2018 [cited 2024 Apr 11]. p. e3015. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jgm.3015>
8. Pearson S, Jia H, Kandachi K. China approves first gene therapy. Nat Biotechnol. 2004;22(1):3.
9. FDA news. FDA approves first gene therapy for treatment of certain patients with Duchenne muscular dystrophy [Internet]. 2023 [cited 2024 Apr 11]. p. 1–2. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapy-treatment-certain-patients-duchenne-muscular-dystrophy>
10. Kumar SR, Markusic DM, Biswas M, High KA, Herzog RW. Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes [Internet]. Vol. 3, Molecular therapy Methods & clinical development. Mol Ther Methods Clin Dev; 2016 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27257611/>
11. European Medicines Agency (EMA). Spinraza [Internet]. 2016 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spinraza>
12. U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA approves first drug for spinal muscular atrophy [Internet]. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-spinal-muscular-atrophy>

13. Ryan Z. Estados Unidos aprueba Kymriah, el primer medicamento de terapia génica contra la leucemia [Internet]. Cells4life. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://cells4life.es/blog/estados-unidos-aprueba-kymriah-primer-medicamento-terapia-genica-la-leucemia/>
14. FDA news. Primera terapia genética en los Estados Unidos es aprobada por la FDA [Internet]. News & Events FDA. 2017 [cited 2024 Apr 11]. p. 4. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/comunicados-de-prensa/primera-terapia-genetica-en-los-estados-unidos-es-aprobada-por-la-fda>
15. Schaffelke1 B, Hewitt CL. Kymriah (tisagenlecleucel) [Internet]. Botanica Marina. 2022 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah-tisagenlecleucel>
16. European Medicines Agency (EMA). Kymriah [Internet]. ema.europa.eu. 2018 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah>
17. U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma [Internet]. 2017 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-car-t-cell-therapy-treat-adults-certain-types-large-b-cell-lymphoma>
18. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Yescarta [Internet]. 2017 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/yescarta>
19. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Luxturna [Internet]. 2017 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/luxturna>
20. U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA approves novel gene therapy to treat patients with a rare form of inherited vision loss [Internet]. 2019 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-novel-gene-therapy-treat-patients-rare-form-inherited-vision-loss>
21. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Zolgensma [Internet]. 2018 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zolgensma>
22. U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA approves innovative gene therapy to treat pediatric patients with spinal muscular atrophy, a rare disease and leading genetic cause of infant mortality [Internet]. 2019 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-innovative-gene-therapy-treat-pediatric-patients-spinal-muscular-atrophy-rare-disease>
23. European Medicines Agency (EMA). Strimvelis | European Medicines Agency [Internet]. European Medicines Agency, Science Medicines Health. 2016 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/strimvelis>
24. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Zynteglo [Internet]. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zynteglo>

25. U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA approves first potentially curative gene therapy for beta thalassemia [Internet]. Children's hospital of Philadelphia. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.chop.edu/news/fda-approves-first-potentially-curative-gene-therapy-beta-thalassemia>
26. European Medicines Agency (EMA). Libmeldy [Internet]. 2021 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/libmeldy>
27. U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA approves first gene therapy for children with metachromatic leukodystrophy [Internet]. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapy-children-metachromatic-leukodystrophy>
28. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Lyfgenia [Internet]. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/lyfgenia>
29. U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA approves first gene therapies to treat patients with sickle cell disease [Internet]. 2021 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapies-treat-patients-sickle-cell-disease>
30. Cui Z, Liu H, Zhang H, Huang Z, Tian R, Li L, et al. The comparison of ZFNs, TALENs, and SpCas9 by GUIDE-seq in HPV-targeted gene therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 2021 Dec 3 [cited 2024 Apr 11];26:1466–78. Available from: <http://www.cell.com/article/S216225312100202X/fulltext>
31. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* [Internet]. 2011 Aug [cited 2024 Apr 11];188(4):773–82. Available from: </pmc/articles/PMC3176093/>
32. Shamshirgaran Y, Liu J, Sumer H, Verma PJ, Taheri-Ghahfarokhi A. Tools for efficient genome editing; ZFN, TALEN, and CRISPR. In: *Applications of genome modulation and editing* [Internet]. Humana Press Inc.; 2022 [cited 2024 Apr 11]. p. 29–46. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-2301-5_2
33. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2024 Apr 11];31(7):397–405. Available from: </pmc/articles/PMC3694601/>
34. Wally V, Murauer EM, Bauer JW. Spliceosome-mediated trans-splicing: the therapeutic cut and paste [Internet]. Vol. 132, *Journal of investigative dermatology*. *J Invest Dermatol*; 2012 [cited 2024 Apr 11]. p. 1959–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22495179/>
35. Berger A, Maire S, Gaillard MC, Sahel JA, Hantraye P, Bemelmans AP. mRNA trans-splicing in gene therapy for genetic diseases [Internet]. Vol. 7, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. John Wiley & Sons, Ltd; 2016 [cited 2024 Apr 11]. p. 487–98. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/wrna.1347>
36. Altae-Tran H, Kannan S, Suberski AJ, Mears KS, Demircioglu FE, Moeller L, et al. Uncovering the functional diversity of rare CRISPR-Cas systems with deep terascale clustering. *Science* (80-) [Internet]. 2023 Dec 25 [cited 2024 Apr 11];382(6673):1910.

- Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.adi1910>
37. Pennisi E. The CRISPR craze [Internet]. Vol. 341, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2013 [cited 2024 Apr 11]. p. 833–6. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.341.6148.833>
 38. Shapiro L. Casgevy (exagamglogene autotemcel) for sickle cell disease [Internet]. *Sickle Cell Disease News*. 2024 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://sicklecellanemianews.com/ctx001-sickle-cell-disease>
 39. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Casgevy [Internet]. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/casgevy>
 40. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, de la Cruz F. Mobility of Plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(3):434–52.
 41. Millan AS, Peña-Miller R, Toll-Riera M, Halbert Z V., McLean AR, Cooper BS, et al. Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. *Nat Commun* [Internet]. 2014 Oct 10 [cited 2024 Apr 11];5(1):5208. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms6208>
 42. Dewan I, Uecker H. A mathematician’s guide to plasmids: an introduction to plasmid biology for modellers [Internet]. Vol. 169, *Microbiology*. Microbiology Society; 2023 [cited 2024 Apr 11]. p. 001362. Available from: <https://pmc/articles/PMC10433428/>
 43. Khan SA. Plasmid rolling-circle replication: recent developments. *Mol Microbiol*. 2000;37(3):477–84.
 44. Ruiz-Masó JA, Machón C, Bordanaba-Ruiseco L, Espinosa M, Coll M, del Solar G. Plasmid rolling-circle replication. *Plasmids Biol Impact Biotechnol Discov* [Internet]. 2015 Feb 27 [cited 2024 Apr 11];45–69. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.plas-0035-2014>
 45. Bennett CF. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age [Internet]. Vol. 70, *Annual review of medicine*. Annual Reviews Inc.; 2019 [cited 2024 Apr 11]. p. 307–21. Available from: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-med-041217-010829>
 46. Mansoori B, Shotorbani SS, Baradaran B. RNA interference and its role in cancer therapy [Internet]. Vol. 4, *Advanced pharmaceutical bulletin*. Tabriz University of Medical Sciences; 2014 [cited 2024 Apr 11]. p. 313. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25436185>
 47. Lares MR, Rossi JJ, Ouellet DL. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications [Internet]. Vol. 28, *Trends in biotechnology*. Elsevier; 2010 [cited 2024 Apr 11]. p. 570–9. Available from: <http://www.cell.com/article/S0167779910001253/fulltext>
 48. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs [Internet]. Vol. 136, *Cell*. Elsevier; 2009 [cited 2024 Apr 11]. p. 642–55. Available from: <http://www.cell.com/article/S009286740900083X/fulltext>
 49. Gavrillov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies

- [Internet]. Vol. 85, The Yale journal of biology and medicine. Yale Journal of Biology and Medicine; 2012 [cited 2024 Apr 11]. p. 187. Available from: [/pmc/articles/PMC3375670/](#)
50. Paunovska K, Loughrey D, Dahlman JE. Drug delivery systems for RNA therapeutics. *Nat Rev Genet.* 2022;23(5):265–80.
 51. Cheng J, Novati G, Pan J, Bycroft C, Žemgulyte A, Applebaum T, et al. Accurate proteome-wide missense variant effect prediction with AlphaMissense. *Science* (80-) [Internet]. 2023 Sep 22 [cited 2024 Apr 11];381(6664):7492. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.adg7492>
 52. Theodoris C V., Xiao L, Chopra A, Chaffin MD, Al Sayed ZR, Hill MC, et al. Transfer learning enables predictions in network biology. *Nature* [Internet]. 2023 May 31 [cited 2024 Apr 11];618(7965):616–24. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-023-06139-9>
 53. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy [Internet]. Vol. 4, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group; 2003 [cited 2024 Apr 11]. p. 346–58. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrg1066>
 54. Kohn DB, Chen YY, Spencer MJ. Successes and challenges in clinical gene therapy. *Gene Ther* [Internet]. 2023 Nov 8 [cited 2024 Apr 11];30(10):738–46. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41434-023-00390-5>
 55. Daley J. Gene therapy arrives. *Nature.* 2019 Dec 5;576(7785):S12–3.
 56. Golchin A, Farahany TZ. Biological products: cellular therapy and FDA approved products [Internet]. Vol. 15, *Stem cell reviews and reports*. Humana Press Inc.; 2019 [cited 2024 Apr 11]. p. 166–75. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12015-018-9866-1>
 57. U.S. Food and Drug Administration. Approved Cellular and Gene Therapy Products. *US Food Drug Adm* [Internet]. 2024 [cited 2024 Apr 11]; Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>
 58. Cynober T. Why are there only 11 cell and gene therapies in Europe? *Labiotech* [Internet]. 2018 [cited 2024 Apr 11]; Available from: <https://www.labiotech.eu/in-depth/atmp-cell-gene-therapy-ema/>
 59. Zhao Z, Anselmo AC, Mitragotri S. Viral vector-based gene therapies in the clinic. Vol. 7, *Bioengineering and Translational Medicine*. John Wiley and Sons Inc; 2022.
 60. Poveda-Andrés JL, Ruiz-Caldes MJ, Carreras-Soler MJ, Clopés-Estela A, Flores-Moreno S, García-Pellicer J, et al. Pharmacotherapeutic management of advanced therapy medicinal products. *Farm Hosp* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 Apr 11];46(2):88–95. Available from: <https://www.revistafarmaciahospitalaria.es//es-pharmacotherapeutic-management-advanced-therapy-medicinal-articulo-S1130634323001666>
 61. Giacca M, Zacchigna S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. Vol. 161,

- Journal of controlled release. Elsevier; 2012. p. 377–88.
62. De Jesus MB, Zuhorn IS. Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: Properties and molecular mechanisms [Internet]. Vol. 201, Journal of Controlled Release. Elsevier B.V.; 2015. p. 1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.01.010>
 63. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* (80-) [Internet]. 1996 Apr 12 [cited 2024 Apr 11];272(5259):263–7. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.272.5259.263>
 64. Hanlon KS, Kleinstiver BP, Garcia SP, Zaborowski MP, Volak A, Spirig SE, et al. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1):4439. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31570731>
 65. Tekade RK, Maheshwari R, Tekade M, Chougule MB. Solid Lipid Nanoparticles for Targeting and Delivery of Drugs and Genes. In: *Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017. p. 256–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809717-5.00010-5>
 66. Suñé-Pou M, Prieto-Sánchez S, El Yousfi Y, Boyero-Corral S, Nardi-Ricart A, Nofrerias-Roig I, et al. Cholesteryl oleate-loaded cationic solid lipid nanoparticles as carriers for efficient gene-silencing therapy. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:3223–33.
 67. Strauss JH, Strauss EG. Viruses Whose Life Cycle Uses Reverse Transcriptase. In: *Viruses and Human Disease*. 2nd ed. London, UK: Academic Press; 2008. p. 211–59.
 68. Schambach A, Zychlinski D, Ehrnstroem B, Baum C. Biosafety features of lentiviral vectors [Internet]. Vol. 24, *Human Gene Therapy*. Mary Ann Liebert, Inc.; 2013 [cited 2024 Apr 11]. p. 132–42. Available from: </pmc/articles/PMC3581032/>
 69. Chang J. Adenovirus vectors: excellent tools for vaccine development [Internet]. Vol. 21, *Immune Network*. The Korean Association of Immunologists; 2021 [cited 2024 Apr 11]. Available from: </pmc/articles/PMC7937504/>
 70. Kamel MS, Munds RA, Verma MS. The Quest for Immunity: Exploring Human Herpesviruses as Vaccine Vectors [Internet]. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2023 [cited 2024 Apr 11]. p. 16112. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/22/16112/htm>
 71. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy [Internet]. Vol. 31, *BioDrugs*. Springer; 2017 [cited 2024 Apr 11]. p. 317–34. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40259-017-0234-5>
 72. Merten OW. Development of Stable Packaging and Producer Cell Lines for the Production of AAV Vectors [Internet]. Vol. 12, *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2024 [cited 2024 Apr 11]. p. 384. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/12/2/384/htm>
 73. Kulkarni JA, Cullis PR, Van Der Meel R. Lipid nanoparticles enabling gene therapies:

- from concepts to clinical utility. *Nucleic Acid Ther* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2024 Apr 13];28(3):146–57. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/nat.2018.0721>
74. Capra E, Gennari A, Loche A, Temps C. Viral-vector therapies at scale: Today 's challenges and future opportunities. McKinsey Co [Internet]. 2022 [cited 2024 Apr 11]; Available from: <https://www.mckinsey.com/industries/life-sciences/our-insights/viral-vector-therapies-at-scale-todays-challenges-and-future-opportunities>
 75. Ganesan P, Narayanasamy D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustain Chem Pharm* [Internet]. 2017;6:37–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scp.2017.07.002>
 76. Rotshild V, Hirsh-Racah B, Miskin I, Muszkat M, Matok I. Comparing the clinical efficacy of COVID-19 vaccines: a systematic review and network meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02321-z>
 77. Roma-Rodrigues C, Rivas-García L, Baptista P V., Fernandes AR. Gene therapy in cancer treatment: why go nano? [Internet]. Vol. 12, *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020 [cited 2024 Apr 11]. p. 233. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/3/233/htm>
 78. Keles E, Song Y, Du D, Dong WJ, Lin Y. Recent progress in nanomaterials for gene delivery applications [Internet]. Vol. 4, *Biomaterials Science*. The Royal Society of Chemistry; 2016 [cited 2024 Apr 10]. p. 1291–309. Available from: <https://pubs-rsc-org.sire.ub.edu/en/content/articlehtml/2016/bm/c6bm00441e>
 79. Geszke-Moritz M, Moritz M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. *Mater Sci Eng C*. 2016;68:982–94.
 80. Mirón-Barroso S, Domènech EB, Trigueros S. Nanotechnology-based strategies to overcome current barriers in gene delivery [Internet]. Vol. 22, *International journal of molecular sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021 [cited 2024 Apr 11]. p. 8537. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/16/8537/htm>
 81. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* [Internet]. 2009 Jan [cited 2024 Apr 12];3(1):16–20. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn900002m>
 82. Paliwal R, Babu RJ, Palakurthi S. Nanomedicine Scale-up Technologies: Feasibilities and Challenges. *Ageing Int*. 2014;15(6):1527–34.
 83. Halamoda-Kenzaoui B, Geertsma R, Pouw J, Prina-Mello A, Carrer M, Roesslein M, et al. Future perspectives for advancing regulatory science of nanotechnology-enabled health products. *Drug Deliv Transl Res* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2024 Apr 11];12(9):2145–56. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13346-022-01165-y>
 84. Abbott KW, Marchant GE, Corley EA. Soft law oversight mechanisms for nanotechnology. *Jurimetrics* [Internet]. 2012 [cited 2024 Apr 11];279–312. Available from: <https://www-jstor-org.sire.ub.edu/stable/23240003>

85. Shan X, Gong X, Li J, Wen J, Li Y, Zhang Z. Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. Vol. 12, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Elsevier; 2022. p. 3028–48.
86. Jeevanandam J, Barhoum A, Chan YS, Dufresne A, Danquah MK. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations [Internet]. Vol. 9, *Beilstein journal of nanotechnology*. Beilstein-Institut; 2018 [cited 2024 Apr 11]. p. 1050–74. Available from: <https://www.beilstein-journals.org/bjnano/articles/9/98>
87. Council of Canadian Academies. Expert Panel on Nanotechnology. Small is different: a science perspective on the regulatory challenges of the nanoscale. Program. Council of Canadian Academies = Conseil des académies canadiennes; 2008.
88. Nanotechnologies Vocabulary. Norma ISO/TS 80004-3:2020 [Internet]. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/es/#iso:std:iso:ts:80004:-3:ed-2:v1:en>
89. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology [Internet]. 2014 [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology>
90. Suñé-Pou M. Cholesteril oleate-loaded solid lipid nanoparticles for the vectorization of nucleic acids. Universitat de Barcelona; 2019.
91. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy-an overview [Internet]. Vol. 9, *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. JCDR Research & Publications Private Limited; 2015 [cited 2024 Apr 11]. p. GE01. Available from: </pmc/articles/PMC4347098/>
92. Wang C, Pan C, Yong H, Wang F, Bo T, Zhao Y, et al. Emerging non-viral vectors for gene delivery. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Apr 11];21(1):272. Available from: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-023-02044-5>
93. Liu Z, Chen K, Davis C, Sherlock S, Cao Q, Chen X, et al. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Aug 15 [cited 2024 Apr 11];68(16):6652–60. Available from: </cancerres/article/68/16/6652/540792/Drug-Delivery-with-Carbon-Nanotubes-for-In-vivo>
94. Qiao Q, Liu X, Yang T, Cui K, Kong L, Yang C, et al. Nanomedicine for acute respiratory distress syndrome: The latest application, targeting strategy, and rational design. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2021;11(10):3060–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.04.023>
95. Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2012 Mar 12 [cited 2024 Apr 11];41(7):2740–79. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2012/cs/c1cs15237h>

96. Gidwani B, Sahu V, Shukla SS, Pandey R, Joshi V, Jain VK, et al. Quantum dots: Prospectives, toxicity, advances and applications. Vol. 61, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Elsevier; 2021. p. 102308.
97. Yang H, Kao WJ. Dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications [Internet]. Vol. 17, *Journal of biomaterials science, polymer edition*. Taylor & Francis Group; 2006 [cited 2024 Apr 11]. p. 3–19. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/156856206774879171>
98. Zielinska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Nagasamy Venkatesh D, et al. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology [Internet]. Vol. 25, *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020 [cited 2024 Apr 11]. p. 3731. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/16/3731/htm>
99. Tseu GYW, Kamaruzaman KA. A review of different types of liposomes and their advancements as a form of gene therapy treatment for breast cancer [Internet]. Vol. 28, *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2023 [cited 2024 Apr 11]. p. 1498. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/3/1498/htm>
100. Sinani G, Durgun ME, Cevher E, Özsoy Y. Polymeric-Micelle-Based delivery systems for nucleic acids [Internet]. Vol. 15, *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2023 [cited 2024 Apr 11]. p. 2021. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/8/2021/htm>
101. Jaffal K, Chevillard L, Mégarbane B. Lipid emulsion to treat acute poisonings: mechanisms of action, indications, and controversies [Internet]. Vol. 15, *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2023 [cited 2024 Apr 12]. p. 1396. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/5/1396/htm>
102. Nam HY, Park JH, Kim K, Kwon IC, Jeong SY. Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers [Internet]. Vol. 32, *Archives of pharmacal research*. Springer; 2009 [cited 2024 Apr 12]. p. 639–46. Available from: <https://link.springer-com.sire.ub.edu/article/10.1007/s12272-009-1500-y>
103. Naseri N, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application [Internet]. Vol. 5, *Advanced pharmaceutical bulletin*. Tabriz University of Medical Sciences; 2015 [cited 2024 Apr 12]. p. 305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26504751>
104. Khan MS, Baskoy SA, Yang C, Hong J, Chae J, Ha H, et al. Lipid-based colloidal nanoparticles for applications in targeted vaccine delivery [Internet]. Vol. 5, *Nanoscale Advances*. RSC; 2023 [cited 2024 Apr 12]. p. 1853–69. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2023/na/d2na00795a>
105. Mura P, Maestrelli F, D'Ambrosio M, Luceri C, Cirri M. Evaluation and comparison of solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) as vectors to develop hydrochlorothiazide effective and safe pediatric oral liquid formulations. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021 Mar 24 [cited 2024 Apr 12];13(4):437. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/4/437/htm>

106. Wu J. The enhanced permeability and retention (EPR) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application. *J Pers Med*. 2021;11(8):771.
107. Butt MH, Zaman M, Ahmad A, Khan R, Mallhi TH, Hasan MM, et al. Appraisal for the potential of viral and nonviral vectors in gene therapy: A review [Internet]. Vol. 13, *Genes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2022 [cited 2024 Apr 11]. p. 1370. Available from: [/pmc/articles/PMC9407213/](https://pmc/articles/PMC9407213/)
108. Kalaycioglu GD, Aydogan N. Preparation and investigation of solid lipid nanoparticles for drug delivery. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2016;510:77–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.06.034>
109. Suñé-Pou M, Limeres MJ, Nofrerias I, Nardi-Ricart A, Prieto-Sánchez S, El-Yousfi Y, et al. Improved synthesis and characterization of cholesteryl oleate-loaded cationic solid lipid nanoparticles with high transfection efficiency for gene therapy applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019;180:159–67.
110. Suñé-Pou M, Limeres MJ, Moreno-Castro C, Hernández-Munain C, Suñé-Negre JM, Cuestas ML, et al. Innovative Therapeutic and Delivery Approaches Using Nanotechnology to Correct Splicing Defects Underlying Disease. *Front Genet*. 2020;11:1–22.
111. H. Muller R, Shegokar R, M. Keck C. 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications. *Curr Drug Discov Technol*. 2011 Aug 8;8(3):207–27.
112. Kesharwani R, Sachan A, Singh S, Patel D. Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticle (SLN) based topical gel of etoricoxib. *J Appl Pharm Sci* [Internet]. 2016 [cited 2024 Apr 13];6(10):124–31. Available from: <http://imsear.searo.who.int/handle/123456789/180469>
113. Hu FQ, Yuan H, Zhang HH, Fang M. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int J Pharm*. 2002 Jun 4;239(1–2):121–8.
114. Muller RH, Keck CM. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs-a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. In: *Journal of biotechnology*. Elsevier; 2004. p. 151–70.
115. Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art. Vol. 50, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. Elsevier; 2000. p. 161–77.
116. Bunjes H. Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs [Internet]. Vol. 62, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Oxford Academic; 2010 [cited 2024 Apr 13]. p. 1637–45. Available from: <https://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01024.x>
117. Silva AC, Amaral MH, González-Mira E, Santos D, Ferreira D. Solid lipid nanoparticles (SLN)-based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies. *Colloids Surfaces B*

- Biointerfaces. 2012 May 1;93:241–8.
118. Joshi MD, Müller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. Vol. 71, European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics. Elsevier; 2009. p. 161–72.
 119. Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Müller RH. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm*. 2004 Jun 18;278(1):71–7.
 120. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. In: *Advanced drug delivery reviews*. 2002. p. S131–55.
 121. Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ, Del Pozo-Rodríguez A. Nanomedicines to deliver mRNA: State of the art and future perspectives [Internet]. Vol. 10, *Nanomaterials*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020 [cited 2024 Apr 13]. p. 364. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/2/364/htm>
 122. Severino P, Andreani T, Macedo AS, Figueiro JF, Santana MHA, Silva AM, et al. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. *J Drug Deliv*. 2012 Nov 24;2012:1–10.
 123. Li J, Guo X, Liu Z, Okeke CI, Li N, Zhao H, et al. Preparation and evaluation of charged solid lipid nanoparticles of tetrandrine for ocular drug delivery system: pharmacokinetics, cytotoxicity and cellular uptake studies. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2014 [cited 2024 Apr 13];40(7):980–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/03639045.2013.795582>
 124. Walters RH, Bhatnagar B, Tchessalov S, Izutsu KI, Tsumoto K, Ohtake S. Next generation drying technologies for pharmaceutical applications. Vol. 103, *Journal of pharmaceutical sciences*. Elsevier; 2014. p. 2673–95.
 125. Mukherjee S, Ray S, Thakur RS. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system [Internet]. Vol. 71, *Indian journal of pharmaceutical sciences*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2009 [cited 2024 Apr 13]. p. 349. Available from: </pmc/articles/PMC2865805/>
 126. Subroto E, Andoyo R, Indiarso R. Solid lipid nanoparticles: Review of the current research on encapsulation and delivery systems for active and antioxidant compounds [Internet]. Vol. 12, *Antioxidants*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2023 [cited 2024 Apr 13]. p. 633. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/12/3/633/htm>
 127. Evers MJW, Kulkarni JA, van der Meel R, Cullis PR, Vader P, Schifflers RM. State-of-the-art design and rapid-mixing production techniques of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery. *Small methods*. 2018;2(9):1700375.
 128. Fàbregas A, Sánchez-Hernández N, Tico JR, García-Montoya E, Pérez-Lozano P, Suñé-Negre JM, et al. A new optimized formulation of cationic solid lipid nanoparticles intended for gene delivery: Development, characterization and DNA binding efficiency of TCERG1 expression plasmid. *Int J Pharm* [Internet]. 2014;473(1–2):270–9. Available

- from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.022>
129. Fàbregas A, Prieto S, Suñé-Pou M, Boyero-Corral S, Ticó JR, García-Montoya E, et al. Improved formulation of cationic solid lipid nanoparticles displays cellular uptake and biological activity of nucleic acids. *Int J Pharm* [Internet]. 2017;516(1–2):39–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.026>
 130. Severino P, Szymanski M, Favaro M, Azzoni AR, Chaud M V., Santana MHA, et al. Development and characterization of a cationic lipid nanocarrier as non-viral vector for gene therapy. *Eur J Pharm Sci*. 2015 Jan 23;66:78–82.
 131. Rodenak-Kladniew B, Islan GA, de Bravo MG, Durán N, Castro GR. Design, characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2017;154:123–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.021>
 132. Rompicharla SVK, Bhatt H, Shah A, Komanduri N, Vijayasarathy D, Ghosh B, et al. Formulation optimization, characterization, and evaluation of in vitro cytotoxic potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles for improved anticancer activity. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2017;208:10–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.08.009>
 133. Alnylam Pharmaceuticals. RNAi Therapeutics | Our Approved Products | Alnylam® Pharmaceuticals [Internet]. 2023 [cited 2023 Jul 7]. Available from: <https://www.alnylam.com/our-products>
 134. Huang J, Xiao K. Nanoparticles-based strategies to improve the delivery of therapeutic small interfering RNA in precision oncology [Internet]. Vol. 14, *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2022 [cited 2024 Apr 13]. p. 1586. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/8/1586/htm>
 135. Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, Haisma HJ. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. Vol. 151, *Journal of controlled release*. Elsevier; 2011. p. 220–8.
 136. Ban C, Jo M, Lim S, Choi YJ. Control of the gastrointestinal digestion of solid lipid nanoparticles using PEGylated emulsifiers. *Food Chem*. 2018;239:442–52.
 137. Napoli N, Giannelli G, Antonaci A, Antonaci S. The use of different Peg-interferon α -2b regimens plus ribavirin in HCV-1b-infected patients after rapid virological response does not affect the achievement of sustained virological response. *J Viral Hepat* [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2024 Apr 13];15(4):300–4. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2893.2007.00944.x>
 138. Veronese FM, Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies [Internet]. Vol. 22, *BioDrugs*. Springer; 2008 [cited 2024 Apr 13]. p. 315–29. Available from: <https://link.springer.com/article/10.2165/00063030-200822050-00004>
 139. Yoo J-W, Chambers E, Mitragotri S. Factors that Control the Circulation Time of Nanoparticles in Blood: Challenges, Solutions and Future Prospects. *Curr Pharm Des*. 2010;16(21):2298–307.
 140. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly(ethylene glycol) in drug delivery:

- pros and cons as well as potential alternatives. *Angew chemie Int Ed*. 2010;49(36):6288–308.
141. Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten G, Jiskoot W, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int J Pharm* [Internet]. 2021;601:120586. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>
 142. Kong YW, Dreaden EC. PEG: Will it come back to you? polyethelyne glycol immunogenicity, COVID vaccines, and the case for new PEG derivatives and alternatives. Vol. 10, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. Frontiers Media S.A.; 2022. p. 879988.
 143. Ngamcherdtrakul W, Sangvanich T, Reda M, Gu S, Bejan D, Yantasee W. Lyophilization and stability of antibody-conjugated mesoporous silica nanoparticle with cationic polymer and PEG for siRNA delivery. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:4015.
 144. Tenchov R, Sasso JM, Zhou QA. PEGylated lipid nanoparticle formulations: immunological safety and efficiency perspective [Internet]. Vol. 34, *Bioconjugate Chemistry*. American Chemical Society; 2023 [cited 2024 Apr 10]. p. 941–60. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.bioconjchem.3c00174>
 145. Trenkenschuh E, Savšek U, Friess W. Formulation, process, and storage strategies for lyophilizates of lipophilic nanoparticulate systems established based on the two models paliperidone palmitate and solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm*. 2021;606:120929.
 146. Li J, Ghatak S, El Masry MS, Das A, Liu Y, Roy S, et al. Topical Lyophilized Targeted Lipid Nanoparticles in the Restoration of Skin Barrier Function following Burn Wound. *Mol Ther* [Internet]. 2018;26(9):2178–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.04.021>
 147. Mahri S, Hardy E, Wilms T, De Keersmaecker H, Braeckmans K, De Smedt S, et al. PEGylation of recombinant human deoxyribonuclease I decreases its transport across lung epithelial cells and uptake by macrophages. *Int J Pharm*. 2021;593:120107.
 148. Limeres M, Suñé-Pou M, Prieto-Sánchez S, Moreno-Castro C, Nusblat A., Casrto G., et al. Development and characterization of an improved formulation of cholesteryl oleate-loaded cationic solid-lipid nanoparticles as an efficient non-viral gene delivery system. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2019;184:110533. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110533>
 149. Mallén A, Narváez-Narváez DA, Pujol MD, Navarro E, Maria Suñé-Negre J, García-Montoya E, et al. Development of cationic solid lipid nanoparticles incorporating cholesteryl-9-carboxynonanoate (9CCN) for delivery of antagomiRs to macrophages. *Eur J Pharm Biopharm*. 2024;114238.
 150. Endres T, Zheng M, Beck-Broichsitter M, Kissel T. Lyophilised ready-to-use formulations of PEG-PCL-PEI nano-carriers for siRNA delivery. *Int J Pharm* [Internet]. 2012;428(1–2):121–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.003>
 151. Luo WC, O'Reilly Beringhs A, Kim R, Zhang W, Patel SM, Bogner RH, et al. Impact of

- formulation on the quality and stability of freeze-dried nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2021;169:256–67.
152. Oetjen G-W, Haseley P. Freeze-Drying. In: John Wiley & Sons [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2004 [cited 2024 Apr 14]. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/14356007.h12_h01
 153. Kawasaki H, Shimanouchi T, Kimura Y. Recent development of optimization of lyophilization process. *J Chem.* 2019;2019:1–14.
 154. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. Vol. 58, *Advanced drug delivery reviews.* Elsevier; 2006. p. 1688–713.
 155. Adams GDJ, Cook I, Ward KR. The principles of freeze-drying. In: *Cryopreservation and freeze-drying protocols* [Internet]. Humana Press Inc.; 2015 [cited 2024 Apr 14]. p. 121–43. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2193-5_4
 156. Trenkenschuh E, Friess W. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2021;165:345–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.024>
 157. Aguilar M, Ubach A. Mecanismos de transmisión de calor en un ciclo de liofilización. *FarmEspañalIndustrial.* 2021. p. 138–40.
 158. Doktorovova S, Shegokar R, Fernandes L, Martins-Lopes P, Silva AM, Müller RH, et al. Trehalose is not a universal solution for solid lipid nanoparticles freeze-drying. *Pharm Dev Technol.* 2014;19(8):922–9.
 159. Crawford RJ, Throne JL. Rotational molding polymers. In: Andrew W, editor. *Rotational Molding Technology.* Elsevier; 2001.
 160. Shirane D, Tanaka H, Nakai Y, Yoshioka H, Akita H. Development of an alcohol dilution–lyophilization method for preparing lipid nanoparticles containing encapsulated siRNA. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(8):1291–4.
 161. Dhiman S, Mishra N, Sharma S. Development of PEGylated solid lipid nanoparticles of pentoxifylline for their beneficial pharmacological potential in pathological cardiac hypertrophy. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2015;44(8):1901–8.
 162. Pignatello R, Leonardi A, Pellitteri R, Carbone C, Caggia S, Graziano ACE, et al. Evaluation of new amphiphilic PEG derivatives for preparing stealth lipid nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2013;434:136–44.
 163. Chuang CH, Wu PC, Tsai TH, Fang YP, Tsai YH, Cheng TC, et al. Development of pH-sensitive cationic PEGylated solid lipid nanoparticles for selective cancer-targeted therapy. *J Biomed Nanotechnol.* 2017;13(2):192–203.
 164. Sacha GA, Nail SL. Thermal analysis of frozen solutions: multiple glass transitions in amorphous systems. *J Pharm Sci.* 2009;98(9):3397–405.
 165. Kett V. Development of freeze-dried formulations using thermal analysis and microscopy. *Am Pharm Rev* [Internet]. 2010 [cited 2024 Apr 14];(6):80–7. Available from: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/36885-Development->

- of-Freeze-dried-Formulations-Using-Thermal-Analysis-and-Microscopy/
166. Suñé-Negre JM. Liofilización. In: Faulí Trillo C, editor. Tratado de Farmacia Galénica. Luzán 5 S. Madrid; 1993. p. 305–14.
 167. Gorbenko G, Trusova V. Protein aggregation in a membrane environment. In: Advances in protein chemistry and structural biology. Academic Press Inc.; 2011. p. 113–42.
 168. Rodriguez-Loya J, Lerma M, Gardea-Torresdey JL. Dynamic Light Scattering and Its Application to Control Nanoparticle Aggregation in Colloidal Systems: A Review [Internet]. Vol. 15, Micromachines. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023 [cited 2024 Apr 14]. p. 24. Available from: /pmc/articles/PMC10819909/
 169. Williams DB, Carter CB. The transmission electron microscope. In: Springer Us. Springer US; 1996. p. 3–17.
 170. Woods AE, Stirling JW. Transmission electron microscopy. In: Bancroft's theory and practice of histological techniques [Internet]. Academic Press; 2018 [cited 2024 Apr 14]. p. 434–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122274105007894>
 171. Panigrahi KC, Patra CN, Jena GK, Ghose D, Jena J, Panda SK, et al. Gelucire: A versatile polymer for modified release drug delivery system. Futur J Pharm Sci [Internet]. 2018;4(1):102–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.11.001>
 172. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays [Internet]. Assay guidance manual [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016 [cited 2024 Apr 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
 173. Frigault MM, Lacoste J, Swift JL, Brown CM. Live-cell microscopy-tips and tools. J Cell Sci [Internet]. 2009 Mar 15 [cited 2024 Apr 14];122(6):753–67. Available from: <https://dx.doi.org/10.1242/jcs.033837>
 174. Akter R, Uddin SJ, Grice ID, Tiralongo E. Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. J Nat Med [Internet]. 2014 Jan 12 [cited 2024 Apr 14];68:246–52. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11418-013-0789-5>
 175. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. Cold Spring Harb Protoc [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2024 Apr 14];2016(7):pdb-prot087163. Available from: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2016/7/pdb.prot087163.full>
 176. Matta H, Gopalakrishnan R, Choi S, Prakash R, Natarajan V, Prins R, et al. Development and characterization of a novel luciferase based cytotoxicity assay. Sci Rep [Internet]. 2018 Jan 9 [cited 2024 Apr 14];8(1):199. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-18606-1>
 177. Cheng Z, Garvin D, Paguio A, Stecha P, Wood K, Fan F. Luciferase reporter assay system for deciphering GPCR pathways. Curr Chem Genomics. 2010 Mar 19;4:84.
 178. Smale ST. Luciferase assay. Cold Spring Harb Protoc [Internet]. 2010 May 1 [cited 2024 Apr 14];2010(5):pdb.prot5421. Available from:

- <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2010/5/pdb.prot5421.full>
179. Bioscience B. TWO-Step Luciferase (Firefly & Renilla) Assay System [Internet]. [cited 2024 Apr 14]. Available from: <https://bpsbioscience.com/two-step-luciferase-firefly-renilla-assay-system-60683>
 180. Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm*. 1996;143(2):133–41.
 181. Colombo AP, Briançon S, Lieto J, Fessi H. Project, design, and use of a pilot plant for nanocapsule production. *Drug Dev Ind Pharm*. 2001;27(10):1063–72.
 182. Wang JL, Hanafy MS, Xu H, Leal J, Zhai Y, Ghosh D, et al. Aerosolizable siRNA-encapsulated solid lipid nanoparticles prepared by thin-film freeze-drying for potential pulmonary delivery. *Int J Pharm* [Internet]. 2021;596:120215. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120215>
 183. Kim B, Hosn RR, Remba T, Yun D, Li N, Abraham W, et al. Optimization of storage conditions for lipid nanoparticle-formulated self-replicating RNA vaccines. *J Control Release*. 2023;353:241–53.
 184. Hinrichs WLJ, Manceñido FA, Sanders NN, Braeckmans K, De Smedt SC, Demeester J, et al. The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying. *Int J Pharm*. 2006;311(1–2):237–44.
 185. Amekyeh H, Billa N. Lyophilized drug-loaded solid lipid nanoparticles formulated with beeswax and theobroma oil. *Molecules*. 2021;26(4):1–13.
 186. Maretti E, Rustichelli C, Romagnoli M, Balducci AG, Buttini F, Sacchetti F, et al. Solid Lipid Nanoparticle assemblies (SLNas) for an anti-TB inhalation treatment—A Design of Experiments approach to investigate the influence of pre-freezing conditions on the powder respirability. *Int J Pharm* [Internet]. 2016;511(1):669–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.062>
 187. Tang J, Kuai R, Yuan W, Drake L, Moon JJ, Schwendeman A. Effect of size and pegylation of liposomes and peptide-based synthetic lipoproteins on tumor targeting. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2017;13(6):1869–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.04.009>
 188. Kwon K, Kim J-C. Reduction-Responsive Release of Solid Lipid Nanoparticle Composed of Stearic Acid and Cystamine. *J Nanosci Nanotechnol*. 2018;18(5):3102–9.
 189. 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):1–17.
 190. Song L, Guo Y, Roebuck D, Chen C, Yang M, Yang Z, et al. Terminal PEGylated DNA–gold nanoparticle conjugates offering high resistance to nuclease degradation and efficient intracellular delivery of DNA binding agents. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(33):18707–16.

191. Pignatello R, Pantò V, Impallomeni G, Carnemolla GM, Carbone C, Puglisi G. New amphiphilic conjugates of amino-poly (ethylene glycols) with lipoamino acids as surface modifiers of colloidal drug carriers. *Macromol Chem Phys*. 2013;214(1):46–55.
192. Barua, S; Mitragotri S. Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects. *Nano Today* [Internet]. 2014;9(2):223–43. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
193. Meulewaeter S, Nuytten G, Cheng MHY, De Smedt SC, Cullis PR, De Beer T, et al. Continuous freeze-drying of messenger RNA lipid nanoparticles enables storage at higher temperatures. *J Control Release* [Internet]. 2023;357(March):149–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.03.039>
194. Wiemann S, Keck CM. Are lipid nanoparticles really superior? A holistic proof of concept study. *Drug Deliv Transl Res*. 2022;12(6):1433–44.
195. Amis TM, Renukuntla J, Bolla PK, Clark BA. Selection of cryoprotectant in lyophilization of progesterone-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):892.
196. Poller B, Painter GF, Walker GF. Influence of albumin in the microfluidic synthesis of PEG-PLGA nanoparticles. *Pharm Nanotechnol*. 2019;7(6):460–8.
197. Monteiro PF, Travanut A, Conte C, Alexander C. Reduction-responsive polymers for drug delivery in cancer therapy—Is there anything new to discover? *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2021;13(2):1–16.
198. Bahari LAS, Hamishehkar H. The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers; A comparative literature review. *Adv Pharm Bull* [Internet]. 2016;6(2):143–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2016.021>
199. Nguyen ST, Nguyen HT-L, Truong KD. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomed Res Ther* [Internet]. 2020 Jul 29 [cited 2024 Apr 14];7(7):3855–9. Available from: <http://bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/614>
200. Tapani E, Taavitsainen M, Lindros K, Vehmas T, Lehtonen E. Toxicity of Ethanol in Low Concentrations. *Acta radiol* [Internet]. 1996 May 1 [cited 2024 Apr 14];37(6):923–6. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/02841851960373P296>
201. Reghupaty SC, Sarkar D. Current status of gene therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Aug 28 [cited 2024 Apr 9];11(9):1265. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/9/1265/htm>
202. Grand View Research. Gene therapy market size, share & trend analysis report by indication (acute lymphoblastic leukemia, large b-cell lymphoma), by vector type (lentivirus), by route of administration, by region, and segment forecasts, 2024 - 2030 [Internet]. *Healthcare*. 2024 [cited 2024 Apr 9]. p. 162. Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/gene-therapy-market#>

203. Tavakoli K, Pour-Aboughadareh A, Kianersi F, Poczai P, Etmnan A, Shooshtari L. Applications of CRISPR-Cas9 as an advanced genome editing system in life sciences. *BioTech*. 2021;10(3).
204. BioRender. Custom plasmid maps [Internet]. Science Templates. 2024 [cited 2024 Apr 9]. Available from: <https://www.biorender.com/template/custom-plasmid-maps-2>
205. Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020 Jun 19 [cited 2024 Apr 9];5(1):101. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-0207-x>
206. Singh V, Khan N, Jayandharan GR. Vector engineering, strategies and targets in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2022 Apr 15 [cited 2024 Apr 10];29(5):402–17. Available from: <https://www-nature-com.sire.ub.edu/articles/s41417-021-00331-7>
207. Katouzian I, Jafari SM. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. Vol. 53, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier; 2016. p. 34–48.
208. Narváez-Narváez DA, Duarte-Ruiz M, Jiménez-Lozano S, Moreno-Castro C, Vargas R, Nardi-Ricart A, et al. Comparative Analysis of the Physicochemical and Biological Characteristics of Freeze-Dried PEGylated Cationic Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceuticals*. 2023;16(11):1583.
209. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. Vol. 63, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier; 2011. p. 456–69.
210. Ramos Yacasi GR. Optimización del proceso de liofilización de sistemas nanoestructurados de flurbiprofeno para uso oftálmico y su influencia en el comportamiento biofarmacéutico. Universitat de Barcelona; 2017.
211. Singh S. Lyophilization Process-An Efficient Way to Preserve Perishable Materials [Internet]. Copperpod IP. 2022 [cited 2024 Apr 14]. Available from: <https://www.copperpodip.com/post/lyophilization-process-an-efficient-way-to-preserve-perishable-materials>
212. Scoffin K. Scaling the Scaffolds: Control of Pore Size in Tissue Engineering Scaffolds. *Am Lab* [Internet]. 2011 [cited 2024 Apr 10];5. Available from: <https://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/36280-Scaling-the-Scaffolds-Control-of-Pore-Size-in-Tissue-Engineering-Scaffolds/>
213. Gouws GJ, Shortt N. Microstructured silver surfaces produced by freeze casting for enhanced phase change heat transfer. *J Phys Conf Ser*. 2015;660(1):012045.
214. Weiss JN. Dynamic Light Scattering (DLS) Spectroscopy. In: *Dynamic Light Scattering Spectroscopy of the Human Eye* [Internet]. Springer, Cham; 2022 [cited 2024 Apr 10]. p. 13–7. Available from: https://link-springer-com.sire.ub.edu/chapter/10.1007/978-3-031-06624-5_3
215. Sezer N, Atieh MA, Koç M. A comprehensive review on synthesis, stability, thermophysical properties, and characterization of nanofluids. *Powder Technol* [Internet]. 2019;344:404–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.12.016>

216. Bradbury S, Ford, Brian J, Joy, David C. Transmission electron microscope (TEM) [Internet]. Encyclopedia Britannica. 2018 [cited 2024 Apr 10]. Available from: <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>
217. Biotechnie. Propidium iodide cell viability flow cytometry protocol [Internet]. R&D Systems. 2022 [cited 2024 Apr 10]. Available from: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide>
218. Merck. Firefly/Renilla Dual Luciferase Assay [Internet]. [cited 2024 Apr 10]. Available from: https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Firefly-Renilla-Dual-Luciferase-Assay,MM_NF-SCT152

8. ANEXOS



Article

Comparative Analysis of the Physicochemical and Biological Characteristics of Freeze-Dried PEGylated Cationic Solid Lipid Nanoparticles

David A. Narváez-Narváez ¹, Maria Duarte-Ruiz ², Sandra Jiménez-Lozano ², Cristina Moreno-Castro ^{2,3}, Ronny Vargas ^{1,4}, Anna Nardi-Ricart ¹, Encarna García-Montoya ^{1,5}, Pilar Pérez-Lozano ^{1,5}, Josep M^a Suñé-Negre ^{1,5}, Cristina Hernández-Munain ⁶, Carlos Suñé ^{2,*} and Marc Suñé-Pou ^{1,5}

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; dnarvana20@alumnes.ub.edu (D.A.N.-N.); rvargamo20@alumnes.ub.edu (R.V.); annanardi@ub.edu (A.N.-R.); encarnagarcia@ub.edu (E.G.-M.); perezlo@ub.edu (P.P.-L.); jmsune@ub.edu (J.M.S.-N.); marcsune@ub.edu (M.S.-P)

² Department of Molecular Biology, Institute of Parasitology and Biomedicine “López-Neyra” (IPBLN-CSIC), 18016 Granada, Spain; maduduru@ipb.csic.es (M.D.-R.); sandra_11406@ipb.csic.es (S.J.-L.); cristina.moreno.castro@ulb.be (C.M.-C.)

³ ULB Center for Diabetes Research, Faculty of Medicine, Université Libre de Bruxelles, 1050 Brussels, Belgium

⁴ Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Costa Rica, San José 11801, Costa Rica

⁵ Pharmacotherapy, Pharmacogenetics and Pharmaceutical Technology Research Group, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), 08908 Barcelona, Spain

⁶ Department of Cell Biology and Immunology, Institute of Parasitology and Biomedicine “López-Neyra” (IPBLN-CSIC), 18016 Granada, Spain; chmunain@ipb.csic.es

* Correspondence: csune@ipb.csic.es



Citation: Narváez-Narváez, D.A.; Duarte-Ruiz, M.; Jiménez-Lozano, S.; Moreno-Castro, C.; Vargas, R.; Nardi-Ricart, A.; García-Montoya, E.; Pérez-Lozano, P.; Suñé-Negre, J.M.; Hernández-Munain, C.; et al. Comparative Analysis of the Physicochemical and Biological Characteristics of Freeze-Dried PEGylated Cationic Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 1583. <https://doi.org/10.3390/ph16111583>

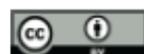
Academic Editor: Okhul Kumar Nag

Received: 7 October 2023

Revised: 30 October 2023

Accepted: 3 November 2023

Published: 9 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cationic solid-lipid nanoparticles (cSLNs) have become a promising tool for gene and RNA therapies. PEGylation (PEG) is crucial in enhancing particle stability and protection. We evaluated the impact of PEG on the physicochemical and biological characteristics of cholesteryl-oleate cSLNs (CO-cSLNs). Several parameters were analyzed, including the particle size, polydispersity index, zeta potential, shape, stability, cytotoxicity, and loading efficiency. Five different formulations with specific PEGs were developed and compared in both suspended and freeze-dried states. Small, homogeneous, and cationic suspended nanoparticles were obtained, with the Gelucire 50/13 (PEG-32 hydrogenated palm glycerides; Gelucire) and DSPE-mPEG2000 (1,2-distearoyl-phosphatidylethanolamine-methyl-polyethyleneglycol conjugate-2000; DSPE) formulations exhibiting the smallest particle size (~170 nm). Monodisperse populations of freeze-dried nanoparticles were also achieved, with particle sizes ranging from 200 to 300 nm and Z potential values of 30–35 mV. Notably, Gelucire again produced the smallest particle size (211.1 ± 22.4), while the DSPE and Myrj S100 (polyoxyethylene (100) stearate; PEG-100 Stearate) formulations had similar particle sizes to CO-cSLNs (~235 nm). The obtained PEGylated nanoparticles showed suitable properties: they were nontoxic, had acceptable morphology, were capable of forming SLNplexes, and were stable in both suspended and lyophilized states. These PEG-cSLNs are a potential resource for in vivo assays and have the advantage of employing cost-effective PEGs. Optimizing the lyophilization process and standardizing parameters are also recommended to maintain nanoparticle integrity.

Keywords: cationic solid lipid nanoparticles; cSLNs; poly(ethylene glycol); PEG; freeze-drying; lyophilization; SLNplexes; gene therapy; stability; morphology

1. Introduction

In the last 30 years, nanotechnology has become a novel interdisciplinary scientific field that has promoted the development of several nanostructures with the potential to

provide controlled drug release and targeted delivery of active agents [1]. Along with the development of new and efficient technologies, nanoparticles (NPs) have attracted great interest and have become a promising tool to establish new therapeutic routes for clinical use, such as gene and ribonucleic acid (RNA) therapies [2,3].

Currently, there are two types of delivery systems, viral and non-viral vectors, which each have specific advantages and limitations [4,5]. Although viral vectors offer high transfection efficacy, they also present several disadvantages, such as marked immunogenicity, insertional mutagenesis [6], deoxyribonucleic acid (DNA) package size limitations, and non-specific effects [7,8]. On the other hand, non-viral vectors (physical or chemical) do not present these problems and are safer alternatives for gene therapy applications [9]. Furthermore, in the last few years, non-viral vectors have shown comparable efficacy to viral vectors. A notable example of this was observed with coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccines, where lipid nanoparticle-based formulations presented superior efficacy compared to conventional viral vector-based vaccines [10].

In this context, solid lipid nanoparticles (SLNs) have increased in importance in recent years and are among the most promising nanoparticle-based methods for nucleic acid delivery [1,8,11]. Cationic solid lipid nanoparticles (cSLNs) are biodegradable and biocompatible non-viral lipid-based nanoparticles with a positive surface charge, that are capable of forming complexes with DNA/RNA (SLNplexes) [4,12]. However, barriers such as complex and difficult-to-scale manufacturing processes, high cost, and low transfection efficiency continue to hamper the widespread application of nanotechnology for clinical purposes in humans, particularly when compared to viral vectors [13]. Nonetheless, increasing efforts have been undertaken to improve these issues [14–16]. In fact, lipid-based nanoparticle formulations are already on the market for treating human diseases [17].

Surface modification is a commonly employed strategy to improve the bioavailability of particles. In this context, the addition of poly(ethylene glycol) (PEG) to the main formulation offers numerous advantages since it is a synthetic, biocompatible polymer extensively utilized in the pharmaceutical, cosmetic, and food industries [18]. Currently, PEG is the most commonly used polymer for coating nanoparticles, and it might be considered the gold standard of stealth polymers [19]. Most commercially available polymer-based stealth drug-delivery systems and those in advanced clinical trials contain PEG, and no other synthetic polymer has yet reached this status [19]. For instance, recently approved lipid nanoparticle drug products for human medical use (onpattro-patisiran-SLN and mRNA-lipid nanoparticle (LNP) COVID-19 vaccines) are PEGylated [20].

PEG, as a surface-modifying agent, “masks” nanoparticles, creating a steric barrier in the form of a PEG layer, which prevents particle aggregation and shields the nanoparticles from interactions with proteins and biomacromolecules (such as nucleases) in the blood, cytosol, and lysosomes [7]. The repulsive properties of PEG play an important role in mitigating enzymatic degradation and preserving the structural integrity of PEG-SLNplexes [19,21]. PEGylation also prevents the adsorption of opsonins (antibodies) onto the particles, resulting in increased stealth efficiency, reduced immunogenicity, prolonged circulation time, and the prevention of aggregation during circulation [18,22,23].

Starting from established formulations of cSLNs with cholesteryl-oleate (CO-cSLNs), which are manufactured without the use of an organic solvent and have demonstrated their efficacy and safety *in vitro* [24,25], this study was designed to improve the current formulation for the possible administration of RNA/DNA *in vivo*. The incorporation of polyethylene glycol (PEG) in the nanostructures may improve their physicochemical, pharmacokinetic, and/or transfection properties due to its amphiphilic nature, which promotes the transformation of nanoparticles into hydrophilic particles, thereby improving their blood circulation time. These improvements increase the likelihood of a specific drug reaching its target site before being identified as foreign and eliminated from the body [19,22].

Therefore, the overall goal of this study was to evaluate the influence of incorporating a new excipient (PEG) on the stability, physicochemical properties, morphology,

and biological characteristics of CO-cSLNs, both before and after lyophilization. Since the incorporation of PEG substantially increases manufacturing costs, five distinct PEG excipients were tested to explore feasible formulations that utilize cost-effective PEGs, potentially widening their commercial accessibility. This comprehensive assessment compared PEGylated and non-PEGylated cSLNs, contributing to a deeper understanding of their performance and potential applications.

2. Results and Discussion

2.1. Physicochemical Properties of the Formulations

2.1.1. Factorial Study

The factorial study aimed to determine the optimal quantity of PEG to be incorporated into the lipid matrix, revealing variations in the physicochemical characteristics, particularly the particle size, based on the amount of PEG added. Among the tested formulations, two (Gelucire and Myrj 52) produced the smallest particle sizes (~225 nm) with a PEG quantity of 150 mg (Table 1). Moreover, the Myrj S100 formulation produced the smallest particle size (222.8 ± 10.1 nm) when 250 mg of PEG was utilized. However, when employing 150 mg, no notable variations in particle size were observed (227.6 ± 7.7 nm). Furthermore, the formulation containing Brij S100 produced the smallest particle size (166.2 ± 23.1 nm), accompanied by the highest employed quantity of PEG (350 mg; Table 1).

Table 1. Comparison of the physicochemical characteristics of four different PEGs incorporated into the core of the cSLN matrix at varying quantities.

PEG ¹	Quantity (mg)	PSD (nm)	PdI	ZP (mV)
Brij S100	50	348.8	0.252	23.4
	150	243.3	0.118	23.7
	250	216.6	0.156	20.8
	350	166.2 ²	0.177	23.0
Gelucire	50	344.2	0.241	37.0
	150	222.8	0.176	34.5
	250	226.7	0.159	38.9
	350	264.6	0.185	33.1
Myrj 52	50	326.4	0.203	31.9
	150	223.7	0.129	32.3
	250	270.5	0.168	30.3
	350	246.8	0.153	28.9
Myrj S100	50	253.5	0.058	26.5
	150	227.6	0.114	29.8
	250	222.8	0.051	28.0
	350	296.6	0.086	29.5

¹ Polyethylene glycol (PEG), particle size distribution (PSD), polydispersity index (PdI), and zeta potential (ZP).

² Bold: the smallest particle size of each quantity evaluated.

The incorporation of polymers, such as PEG, onto the nanoparticle surface can enhance colloidal stability and prolong circulation time through steric stabilization [22,26]. These effects are influenced by the molecular weight and structure characteristics of PEG and are directly correlated with the length and surface density of the PEG employed [22]. Notably, larger PEG chains could enhance the colloidal stability of the SLNs, preventing particle agglomeration and subsequently resulting in a reduction in particle size [18]. In this sense, the number of ethylene glycol repetitions in each PEG, which varies across different formulations, can substantially impact the physicochemical characteristics of the nanoparticles. Formulations containing Gelucire and Myrj 52 have fewer ethylene glycol repetitions (~30–40 times) than Brij S100 and Myrj S100, where the number of repetitions reaches 100. In the case of Brij S100, as a greater quantity of PEG is used, particle sizes tend

to decrease. The extensive PEG coverage on the nanoparticle surface probably results in a more pronounced steric effect between nanoparticles.

However, it is imperative to exercise caution regarding the appropriate quantity of PEG to be incorporated. Excessive amounts may compromise cell transfection efficacy and reduce circulation time due to decreased PEG mobility and flexibility [22,23]. Hence, we selected 150 mg of PEG to integrate into the final formulation (SA, 140 mg + CO, 210 mg + PEG, 150 mg), since we considered this to be the optimal amount for efficient PEGylation of the nanoparticles. The four developed formulations exhibited satisfactory physicochemical properties, resulting in populations of monodisperse nanoparticles (PDI < 0.2) with a cationic surface charge (ZP between 25 and 40 mV) suitable for the formation of SLNplexes [8] (Table 1). PEGylation's effect is further discussed in Section 2.2.

2.1.2. Particle Size, Polydispersity Index and Zeta Potential

We successfully obtained a substantial population of small and homogeneous nanoparticles in all formulations. Nonetheless, the particle size was higher than our initial expectations (Table 2, original protocol). It has been reported that the particle size could be effectively reduced by increasing both the duration (min) and the stirring speed (rpm) during the manufacturing process. This size reduction might be attributed to several factors, including the reduction in the residence time of reactants in the system and the application of shear forces which disperse and fragment larger particles into smaller ones, promoting homogeneous nucleation and enhanced mixing that lead to a better dispersion of the active ingredients, allowing nanoparticles to form uniformly throughout the solution [27–29].

Table 2. Comparison of the physicochemical characteristics of four different PEGs incorporated into the core of the SLN matrix with two different protocols.

PEG (150 mg) ¹	PSD (nm) ²	PDI	ZP (mV)	Original Protocol		
				PSD (nm)	PDI	ZP (mV)
Brij S100	243.3	0.118	23.7	190.90	0.10	25.10
DSPE	—	—	—	171.5	0.131	27.5
Gelucire	222.8	0.176	34.5	171.20	0.16	27.40
Myrj 52	223.7	0.129	32.3	183.10	0.19	31.40
Myrj S100	227.6	0.114	29.8	180.10	0.14	27.40
CO	237.4	0.163	34.8	202.10	0.17	37.40

¹ DSPE-mPEG2000 is the most expensive PEG excipient (1 g = \$500) used in this study. It was only used in the final assays. CO represents 300 mg of cholesteryl oleate, corresponding to the formulation without PEG. ² Particle size distribution (PSD), polydispersity index (PDI), and zeta potential (ZP) of all the formulations manufactured.

Thus, the stirring time and speed were raised from 10 to 15 min and from 20,000 to 24,000 rpm, respectively. Consequently, we achieved a particle size reduction ranging from 30 to 50 nm compared to the original values, with the formulations with Gelucire and DSPE having the smallest particle sizes of ~170 nm, followed by both Myrj formulations (52 and S100), with particle sizes of ~180 nm, and Brij S100, with a particle size of 190 nm. Even the CO-cSLNs exhibited a reduction in particle size, from 237.4 ± 4.9 nm to 202.1 ± 10.7 nm (Table 2).

In addition, in all formulations, the PDI values were less than 0.2 (Table 2, modified protocol), indicating a single population of PEG-cSLNs (monodisperse population) without aggregates. Concerning zeta potential, all PEG-cSLNs showed a positive surface area, with Myrj 52 having the highest ZP (31.4 ± 4.4 mV) and Brij S100 having the lowest ZP (25.1 ± 2.4 mV). The other three formulations (DSPE, Gelucire and Myrj S100) presented ZP values of ~27 mV (Table 2, modified protocol). Each PEG determined unique physicochemical characteristics for each formulation. The different polymers with different conformations produced differences in the nanoparticle surfaces, affecting the size, dispersion, and charge [23].

2.2. Impact of PEG Incorporation in the Formulation

Statistical analysis showed that the PEGylation of CO-SLNs affected the physicochemical properties of the nanoparticles. The particle size was reduced significantly in all PEG-cSLNs except in the formulation with Brij S100 (Figure 1A). No significant differences in the PDI were found, except in the formulation with Brij S100 (Figure 1B). Last, the surface charge decreased significantly due to PEGylation in all five developed formulations (Figure 1C).

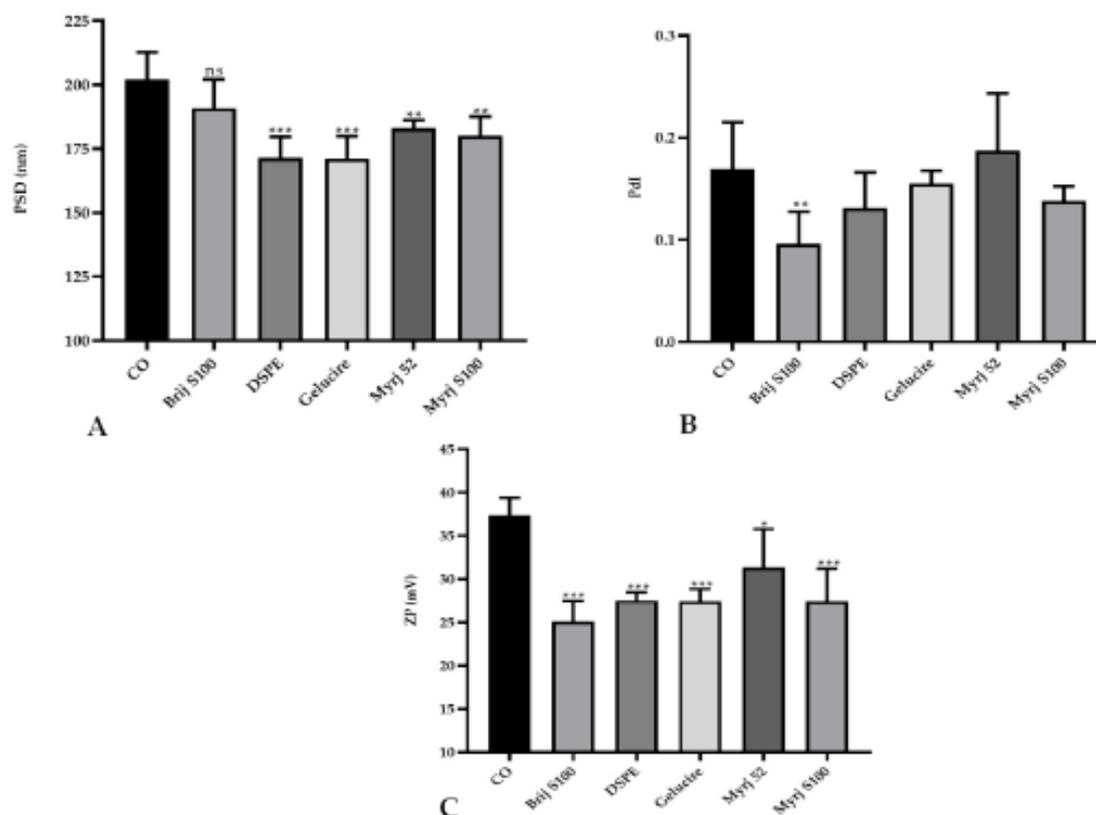


Figure 1. Comparative analysis of the (A) particle size distribution (PSD), (B) polydispersity index (PDI), and (C) zeta potential (ZP; C) between PEGylated and non-PEGylated nanoparticles. CO represents cholesteryl oleate, corresponding to the formulation without PEG. Statistical analysis was performed in triplicate. Bars without an asterisk (*) are not significant (ns), * $p = 0.01$ – 0.05 , ** $p = 0.001$ – 0.01 and *** $p < 0.001$.

The incorporation of a new excipient into an already established formulation to develop CO-cSLNs is a challenge since it affects the physicochemical properties of the nanoparticles. The addition of PEG to the original formulation affected particle size owing to the steric hindrance effect that the polymer performs [18,30]. This effect makes PEG-cSLN smaller (~180 nm) than CO-cSLN (~200 nm) by preventing agglomeration. The incorporation of PEG onto the surface also affected the surface charge of the nanoparticles, possibly due to surface area reduction, which decreases the charge [18].

In this context, statistical analysis showed that PEG-cSLNs developed with the modified protocol, including CO-SLNs, exhibited a significant reduction in particle size (Figure 2A). The PDI remained stable for the two protocols used, and no significant differences were found (Figure 2B). Only the formulations with Gelucire and CO presented significant differences in surface charge, while the other PEGs did not present differences (Figure 2C).

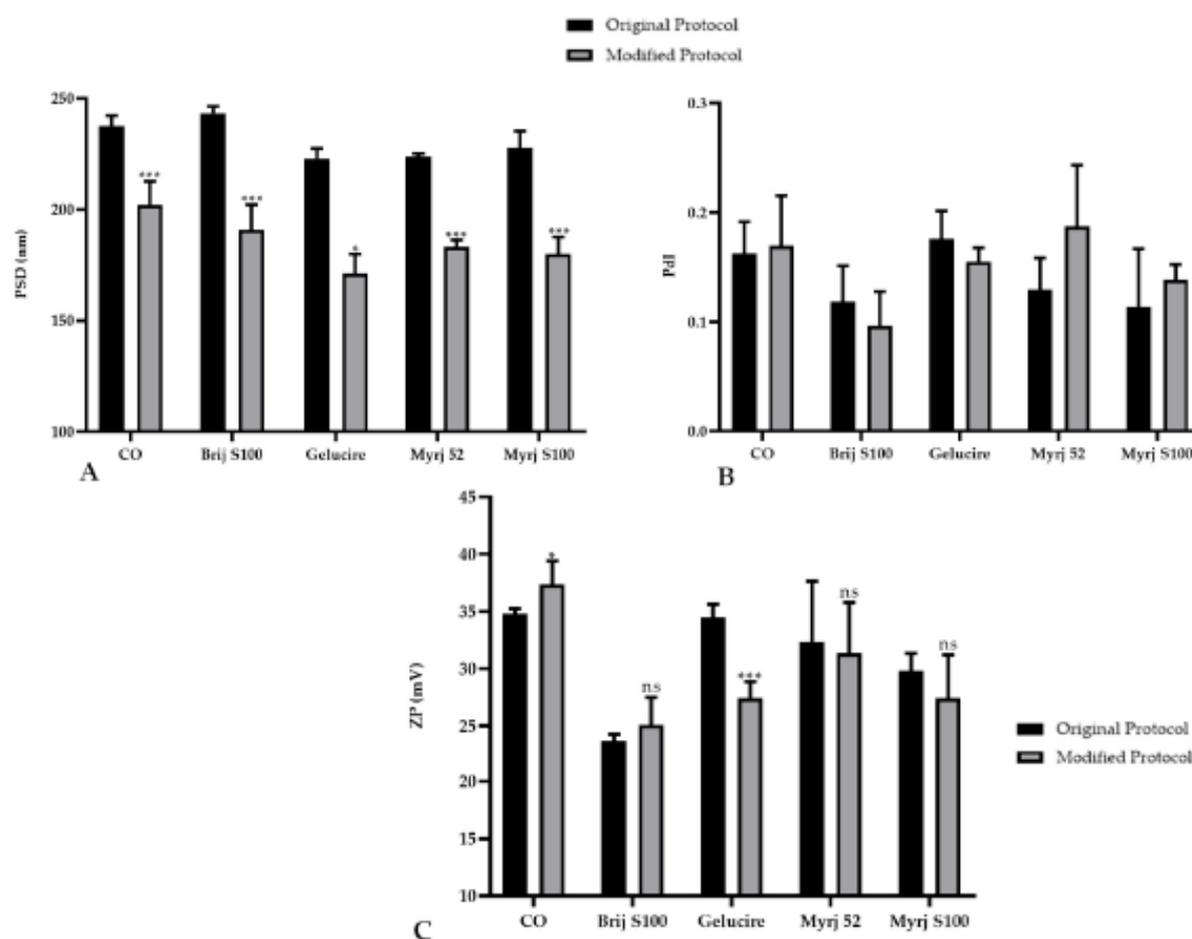


Figure 2 Comparative analysis of the (A) particle size distribution (PSD), (B) polydispersity index (PDI), and (C) zeta potential (ZP) of PEGylated and non-PEGylated nanoparticles with two different protocols. CO represents cholesteryl oleate, corresponding to the formulation without PEG. Statistical analysis was performed in triplicate. Bars without an asterisk (*) are not significant (ns), * $p = 0.01$ – 0.05 and *** $p < 0.001$.

Particle size is a critical attribute that is directly related to the PDI: as the dispersion increases, the agglomeration and consequently the size of nanoparticles increase. These two parameters indicate the quality of the particles with respect to the size distribution, which is the main physicochemical attribute influencing endocytosis-dependent cellular uptake. The mechanisms of internalization depend on the nanoparticle size, surface properties (charge), shape, and types of cells involved [31,32].

2.3. Freeze-Drying of PEG-cSLNs

2.3.1. Glass Transition Temperature (T_g)

The five formulations developed with 150 mg of PEG were lyophilized to facilitate transport and maintain physicochemical characteristics in the long term, improving their storage stability and shelf life. Prior to lyophilization, we determined the glass transition temperature (T_g) of each formulation to establish the correct parameters of the lyophilization process. For an optimal process, T_g should be below the collapse temperature (T_c) of the PEG-cSLNs. T_c is the maximum temperature at which the product can reach sublima-

tion. Freeze-drying requires low temperatures and pressures to eliminate the solvent (in this case, water) in which the PEG-cSLNs are suspended through the sublimation process [33].

The lowest collapse temperature obtained among the formulations was $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Table S1 and Figure S1). Thus, for the entire product to be well lyophilized, the process should be performed at a minimum of 10–20 degrees lower than the aforementioned temperature [30]. Therefore, the freezing temperature used in the lyophilization cycle was $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ to ensure vitrification of the trehalose matrix and the appropriate lyophilization of all formulations [26].

2.3.2. Lyophilization of the PEG-cSLNs

The physicochemical analyses showed the successful production of monodisperse populations of PEG-cSLNs ($\text{PDI} \leq 0.2$) with particle sizes between 200 and 300 nm and Z potential values of 30–35 mV (Table 3). Among the formulations, Gelucire exhibited the smallest particle size (211.1 ± 22.4). Interestingly, the DSPE and Myrj S100 formulations demonstrated particle sizes comparable to those of CO-cSLNs (~ 235 nm). On the other hand, Myrj 52 displayed a higher particle size (280 ± 22.7 nm), while Brij S100 had the highest particle size overall (315.1 ± 15.1 nm), as presented in Table 3.

Table 3. Comparison of the physicochemical characteristics of nanoparticles in aqueous suspensions and lyophilized formulations with and without PEG.

PEG (150 mg) ¹	PSD (nm) ²	PdI	ZP (mV)	PSD (nm)	PdI	ZP (mV)
Suspended SLNs			Lyophilized SLNs			
Brij S100	190.9	0.096	25.1	315.1	0.199	28.0
DSPE	171.5	0.131	27.5	234.6	0.190	36.9
Gelucire	171.2	0.155	27.4	211.1	0.225	32.6
Myrj 52	183.1	0.187	31.4	280	0.256	31.6
Myrj S100	180.1	0.138	27.4	235.9	0.180	29.5
CO	202.1	0.169	37.4	235.3	0.194	44.1

¹ CO represents 300 mg of cholesteryl oleate, corresponding to the formulation without PEG. ² Particle size distribution (PSD), polydispersity index (PdI), and zeta potential (ZP) of all the formulations manufactured.

However, statistical analysis revealed a significant increase in the particle size of the freeze-dried PEG-cSLNs compared to the suspended PEG-cSLNs. Notably, even the CO-cSLNs exhibited a considerable size increase (Figure 3A). The stressful conditions of the freeze-drying process affected the physicochemical characteristics of all of the PEG formulations compared to CO-cSLNs. Previous studies also reported a rise in particle size after freeze-drying, providing further evidence of the effects of lyophilization on nanoparticles [26,30,33–36].

Regarding the PdI, no significant differences were observed between the suspended and freeze-dried PEG-cSLNs of the Gelucire formulation and the two Myrj formulations (52 and S100), suggesting the successful formation of monodisperse PEG-cSLNs without aggregates in these cases. Nevertheless, significant differences were observed for the other two PEGylated formulations (Brij S100 and DSPE), including CO-cSLNs (Figure 3B), revealing the need for further optimization of the freeze-drying process parameters, since steric stabilization might not guarantee the maintenance of physicochemical characteristics during the lyophilization process [37].

Concerning ZP, an increase was observed in all formulations except for the Myrj 52 formulation, where the potential remained stable (Table 3). This might be an advantage for PEGylated cSLNs due to the substantial impact of PEGylation on nanoparticle surface charge. Despite the increase in ZP, no significant differences were found for the Gelucire formulation and the two Myrj formulations (52 and S100) (Figure 3C). In contrast, significant increases in ZP were observed for the other PEGylated formulations (Brij S100 and DSPE) as well as the CO-cSLNs, indicating the influence of the freeze-drying process on ZP. This feature could be important in ensuring the formation of SLNplexes.

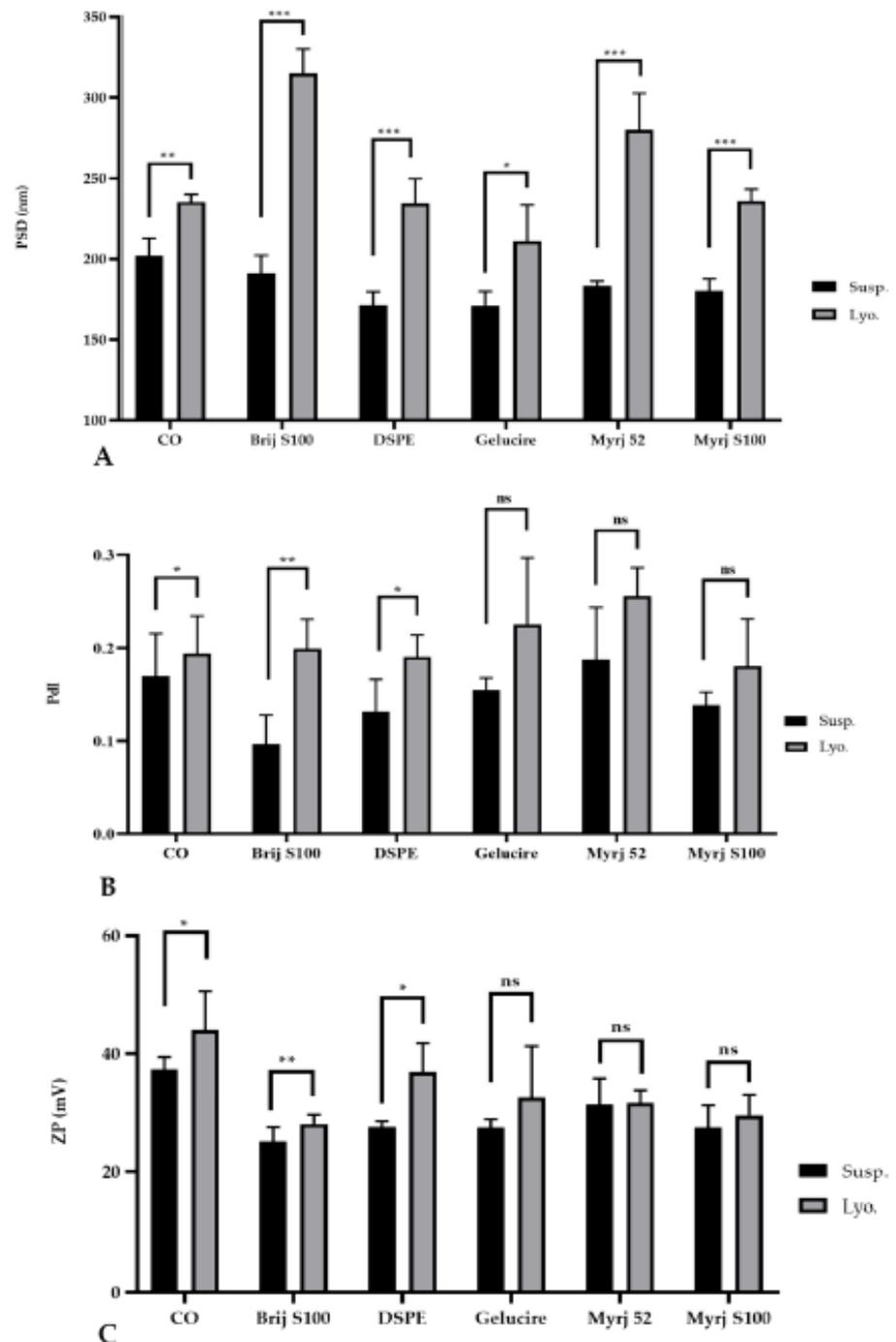


Figure 3. Comparative analysis of the (A) particle size distribution (PSD), (B) polydispersity index (Pdl), and (C) zeta potential (Z) of suspended (Susp.) and freeze-dried (Lyo.) PEGylated and non-PEGylated nanoparticles. CO represents cholesteryl oleate, corresponding to the formulation without PEG. Statistical analysis was performed in triplicate. Not significant (ns), * $p = 0.01$ – 0.05 , ** $p = 0.001$ – 0.01 and *** $p < 0.001$.

Freeze-drying is an alternative to improve the stability and feasibility of nanoparticles due to the poor stability of these colloidal systems. However, it is well documented that the freezing step is the most aggressive part of the process (crystal ice formation) and increases the risk of aggregation and/or coalescence, decreasing the stability of the nanoparticles [26,33,36]. To counteract this effect, lyoprotectants or cryoprotectants (amorphous disaccharides) are crucial because they protect and stabilize nanoparticles against freezing and drying stress during lyophilization, thus reducing aggregation, shortening reconstitution time and decreasing residual moisture [26,36]. These agents form a stable amorphous glassy matrix (vitrification hypothesis) that interacts with the surface of the nanoparticles, incorporating and immobilizing them and preventing their fusion or aggregation [30,38].

Nonetheless, the vitrification effect alone is insufficient to preserve the nanoparticles, as their physicochemical properties are also influenced by PEGylation, as we have previously demonstrated. It has been reported that a PEG-lipid with a longer PEG chain (MW 5000) and a shorter lipid scaffold (dimyristoyl glycerol) exhibited enhanced cryoprotective abilities (DMG-PEG5000) [36]. In this context, cSLNs with longer PEG chains (DSPE and Myrj S100) had particle sizes similar to those of CO-cSLNs, potentially due to the cryoprotective effects of PEG. It is essential to consider the characteristics of the PEG layer since they determine the stealth properties based on the flexibility of the PEG chains on the nanoparticle surface. The efficacy of a nanoparticle's coating depends on the length and surface density of the PEG chains [22]. Furthermore, we observed that by optimizing the lyophilization process and standardizing the different parameters of the procedure, it is possible to maintain the nanoparticle's physicochemical characteristics and integrity (unpublished data).

2.4. Morphology of Suspended and Freeze-Dried PEG-cSLNs

TEM images confirmed the presence of a significant proportion of spherical and well-defined PEG-cSLNs in both suspended and freeze-dried states. These images revealed the presence of SLNs with a solid matrix and the absence of amorphous structures in all developed formulations (Figure 4), indicating that the lyophilization process had no discernible impact on the nanoparticle shape. Moreover, the morphology was substantially different among the formulations, as the physicochemical characteristics were influenced by the specific PEGylated excipients employed in the nanoparticle matrix. The shape most widely used in designing drug delivery carriers is spheres. Nevertheless, particles with worm-like shapes, such as ellipsoidal, cylindrical, and discoidal shapes, or filomicelles, can achieve better accumulation within tumors [39]. In addition to particle size, PDI, and Z potential, shape is considered a crucial parameter, as it also determines the behavior of particles in various processes, including blood circulation, targeting, cellular uptake, and intracellular trafficking [22]. The interaction between shape and cell specificity is critical for cellular uptake, since shape also affects biological responses and enhances the targeting of antibody-coated nanoparticles to the endothelium [32].

2.5. Stability Study of the PEG-cSLNs

2.5.1. One-Month Stability

Stability studies were carried out over 30 days at 4 °C and 25 °C to determine the temporal stability of suspended PEG-cSLNs. PEG-cSLNs in all formulations exhibited better stability at 4 °C than 25 °C since the SLN population remained monodisperse (PDI < 0.2) throughout the 30 days (Figure 5). However, the PDI values of all formulations at 25 °C and one (Brij S100) at 4 °C showed a correlation with the elapsed time (Table S2). Thus, the PDIs increased over time, with indices exceeding 0.2 at approximately day 20.

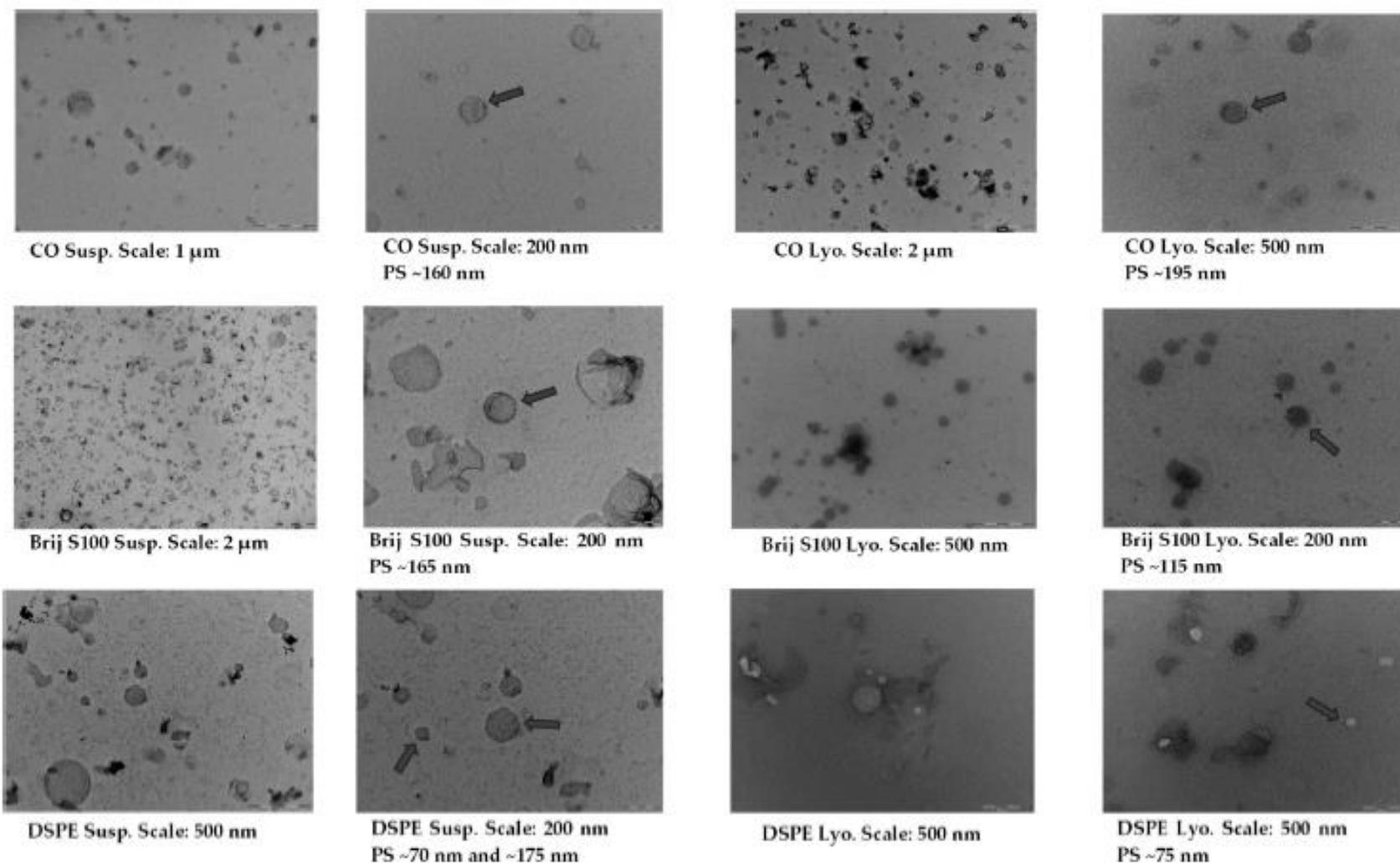


Figure 4. Cont.

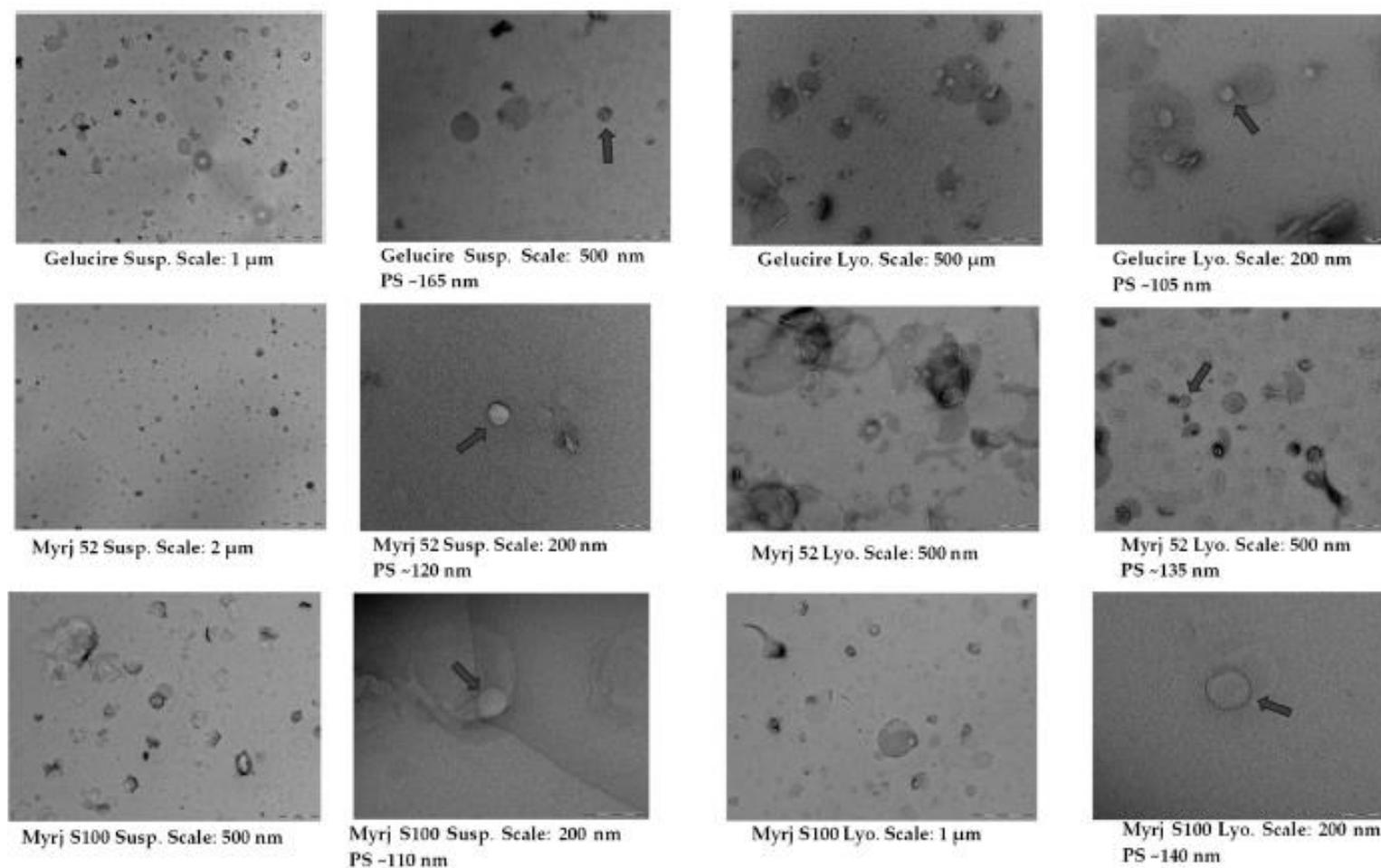


Figure 4. TEM images and morphological analysis of suspended and freeze-dried PEGylated and non-PEGylated nanoparticles. Abbreviations: Susp., nanoparticles suspended in an aqueous solution; Lyo., lyophilized nanoparticles; CO, cholesteryl oleate corresponding to the formulation without PEG. Gray arrows indicate particle size (PS).

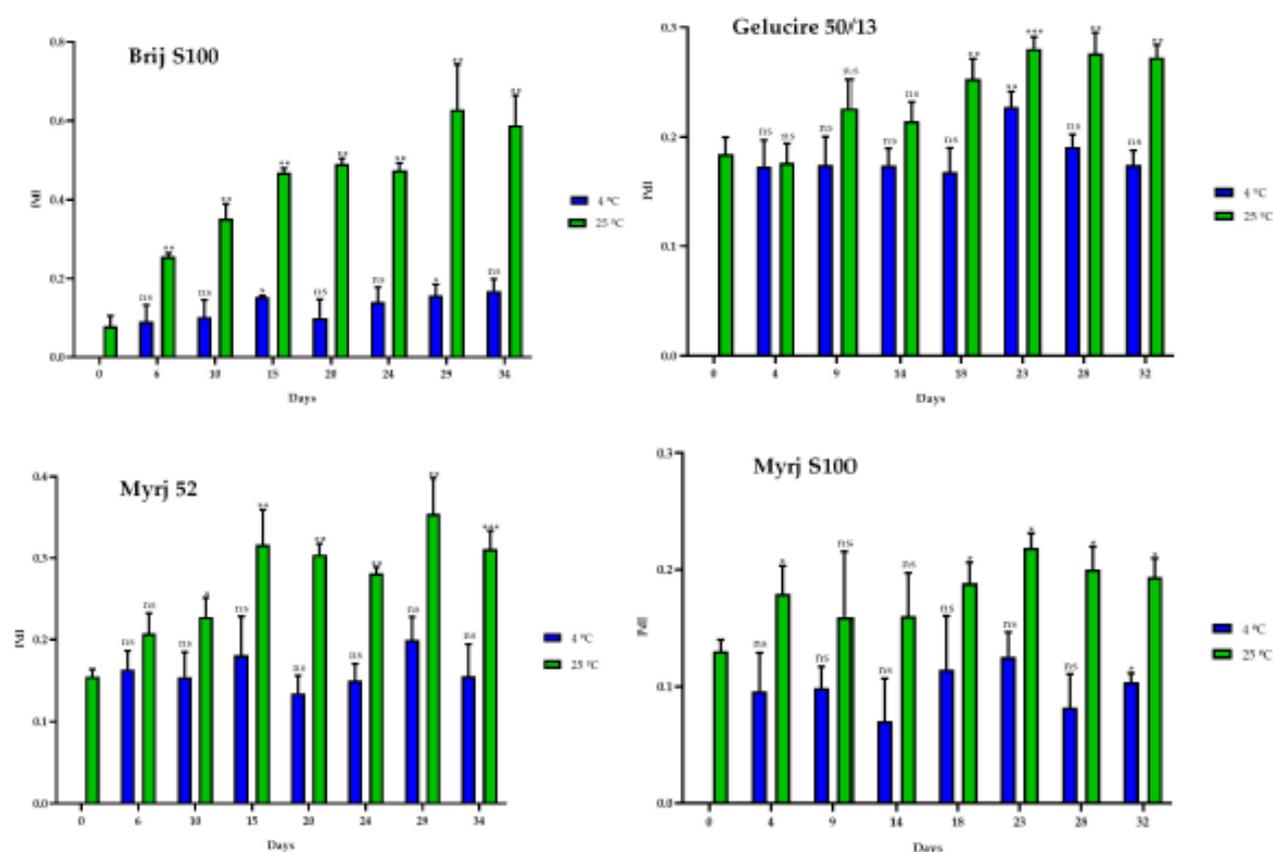


Figure 5. Polydispersity index (PdI) of the four PEGylated nanoparticles over a 30-day period at different temperatures (4 °C and 25 °C). Statistical analysis was performed in triplicate. Not significant (ns), * $p = 0.01$ – 0.05 , ** $p = 0.001$ – 0.01 and *** $p < 0.001$.

Similarly, the particle sizes of all formulations were found to be smaller at 4 °C than at 25 °C. Nonetheless, it is notable that there was an increase in size compared to the initial manufacturing day (Figure 6). Consequently, a correlation was observed between the elapsed days and the particle sizes for all formulations at both temperatures. As the days passed, the size of the PEG-cSLNs progressively increased (Table S2).

Finally, the ZP values of the PEG-cSLNs remained within the required range of 25–45 mV during the 30-day storage period (Figure 7). Moreover, correlations were observed between the ZP and the elapsed days at 4 °C for all formulations, except for the Brij S100 formulation (Table S2). Thus, as the days passed, the ZP of the PEG-cSLNs increased. From approximately day 23, the Z potential increased.

Parameters such as particle size and size distribution (PdI) are important factors in evaluating the stability of aqueous colloidal systems [31]. In this context, Suñé-Pou et al. (2019) reported that CO-cSLNs began to aggregate from day 18, reaching maximum aggregation on day 24 at 4 °C. For the best performance, they recommended storing these nanoparticles for a maximum of 15 days at 4 °C. Nonetheless, PEG-cSLNs were more stable (~30 days) than the original formulations due to favorable factors such as the steric stability conferred by PEG and the surface charge established by the cationic lipid used.

Steric stabilization reduces the tendency of particles to aggregate, producing formulations with increased stability during production, storage, and application [19,23]. Moreover, surface charge might improve stabilization due to the repulsive electrostatic forces that exist between nanoparticles [30,40]. The cationic lipid contains amines whose nitrogen atoms become protonated when exposed to an aqueous medium, charging the nanoparticle sur-

face [24]. Therefore, increasing the ZP provides greater stability by increasing electrostatic repulsion [40].

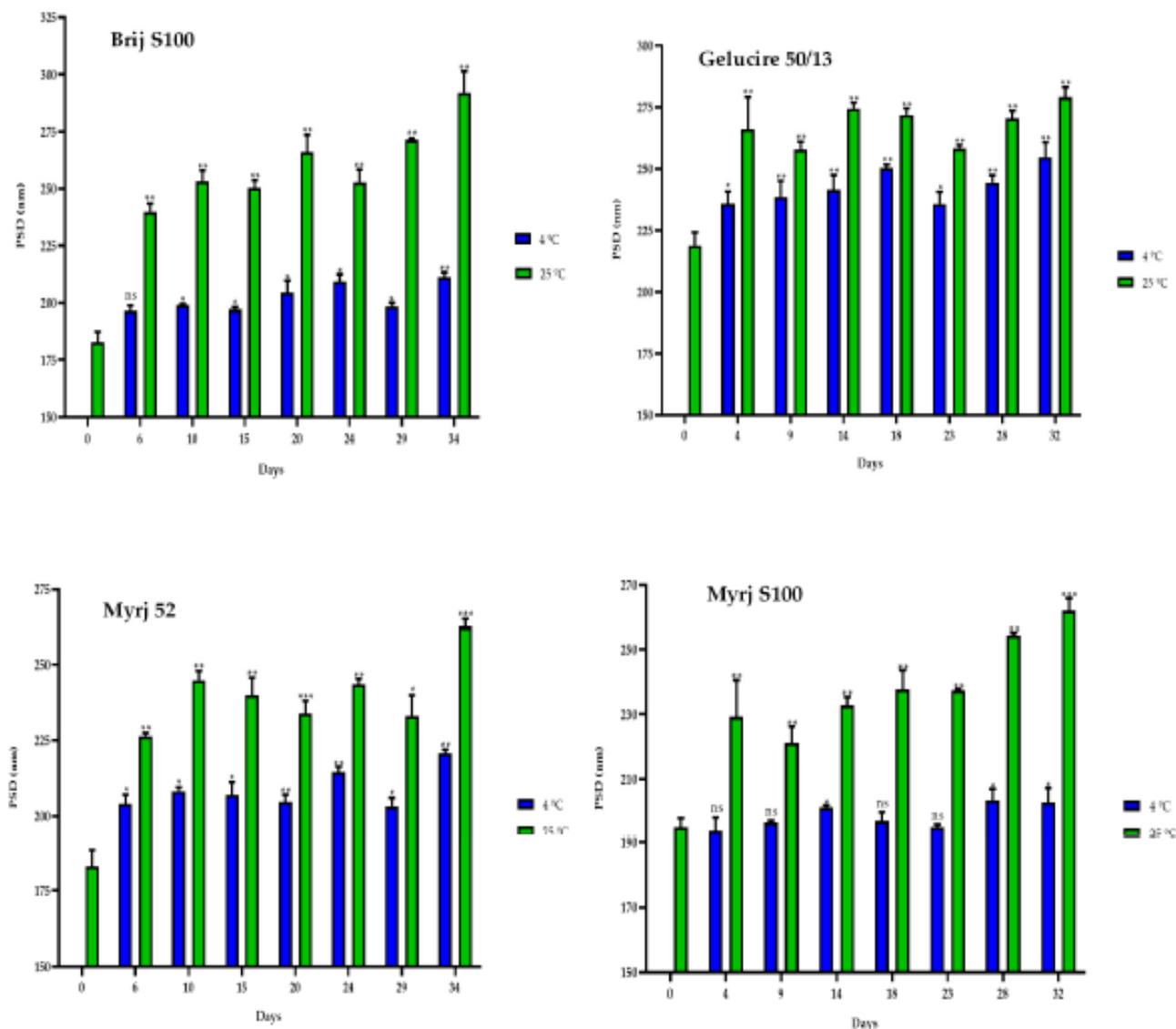


Figure 6. Particle size distribution (PSD) of the four PEGylated nanoparticles over a 30-day period at different temperatures (4 °C and 25 °C). Statistical analysis was performed in triplicate. Statistical analysis was performed in triplicate. Not significant (ns), * $p = 0.01$ – 0.05 , ** $p = 0.001$ – 0.01 and *** $p < 0.001$.

These two factors played a crucial role in enhancing the overall stability of these PEG-cSLNs [33]. Nevertheless, nanoparticles are more susceptible to changes in stability than microsystems due to their larger specific surface area [31,40]. The increased surface area makes nanoparticles more prone to aggregation, which becomes an important issue in comparison to other microscale drug delivery systems [31,40]. However, despite irreversible nanoparticle aggregation driven by van der Waals attractive forces [33], we were able to obtain satisfactory stability for these nanoparticles at 4 °C.

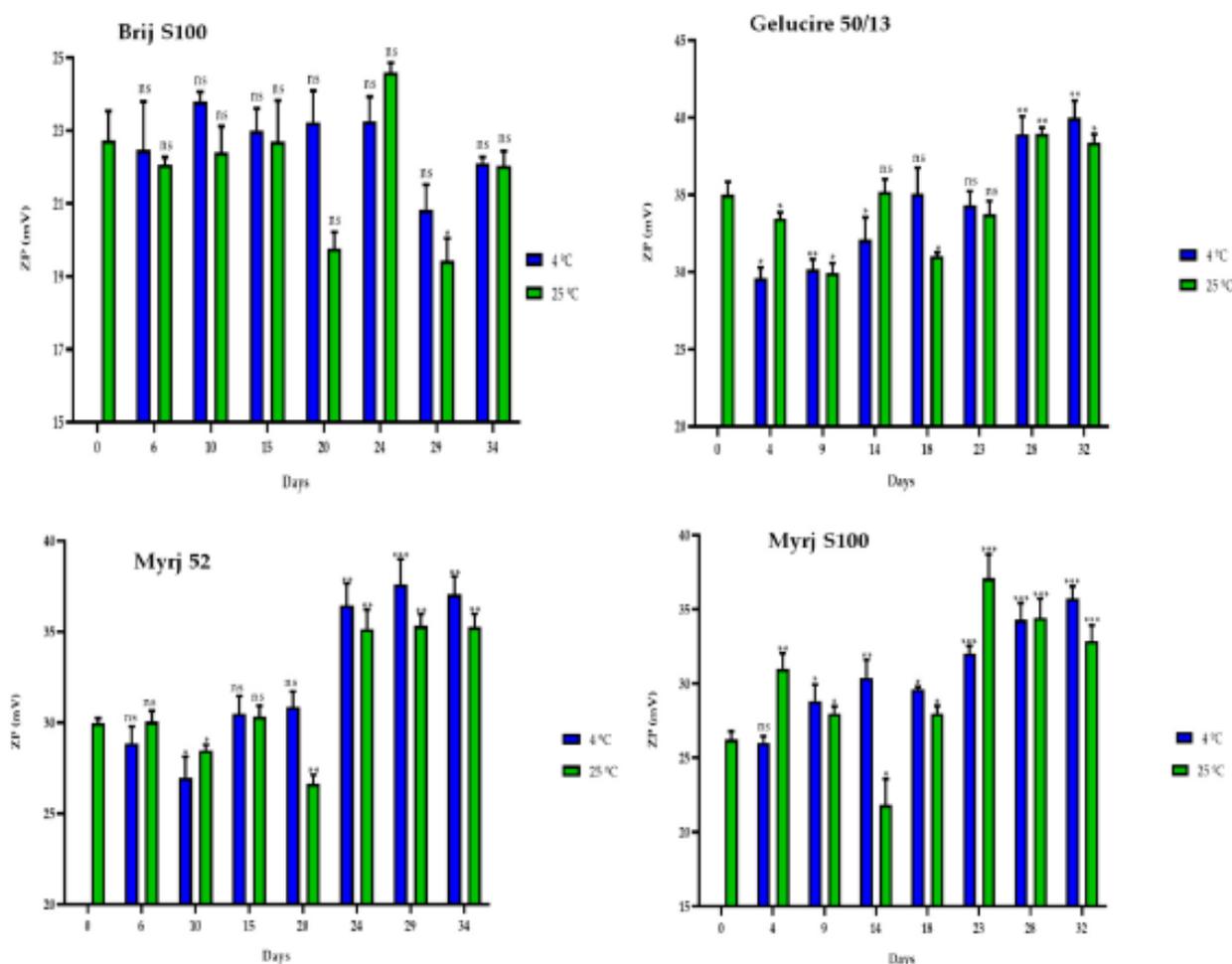


Figure 7. Zeta potential (ZP) of the four PEGylated nanoparticles over a 30-day period at different temperatures (4 °C and 25 °C). Statistical analysis was performed in triplicate. Not significant (ns), * $p = 0.01$ – 0.05 , ** $p = 0.001$ – 0.01 and *** $p < 0.001$.

2.5.2. One-Year Stability

In the same way, stability studies of freeze-dried PEG-cSLNs were performed at 4 °C and 25 °C for one year. Similar to suspended PEG-cSLNs, the stability of all PEG formulations was better preserved at 4 °C than at 25 °C since the PDI values remained at approximately 0.2 (Figure 8). These results indicate that the reconstituted PEG-cSLNs maintained a monodisperse population dispersion for one year, except for the formulation with Brij S100, which was the PEG most affected by time. Furthermore, a correlation was observed between PDI and the elapsed time for the formulations with Gelucire and Myrj 52 at 4 °C (Table S3). Nonetheless, no correlation was found for the remaining formulations (Brij S100, DSPE, and Myrj S100). This factor might be attributed to the longer carbon chains present in these PEGs, particularly DSPE, which leads to an increased repulsion force owing to the steric effect on the completely coated cSLNs [18,41].

Similarly, the sizes of the PEG-cSLNs (230–250 nm) were stable at 4 °C in all formulations, including that with Brij S100 (Figure 9). Surprisingly, in some cases, the PEG-cSLNs were smaller at 25 °C than at 4 °C, while in others, they were larger (DSPE, Gelucire, Myrj 52 and S100), indicating instability at room temperature. This suggests that maintaining the nanoparticles at 4 °C is the most effective approach to prevent their agglomeration. Moreover, no correlation was found between particle size and elapsed time at either temperature

analyzed, except in the formulation with Brij S100 at 4 °C (Table S3). This means that the particle size remained stable throughout the entire year.

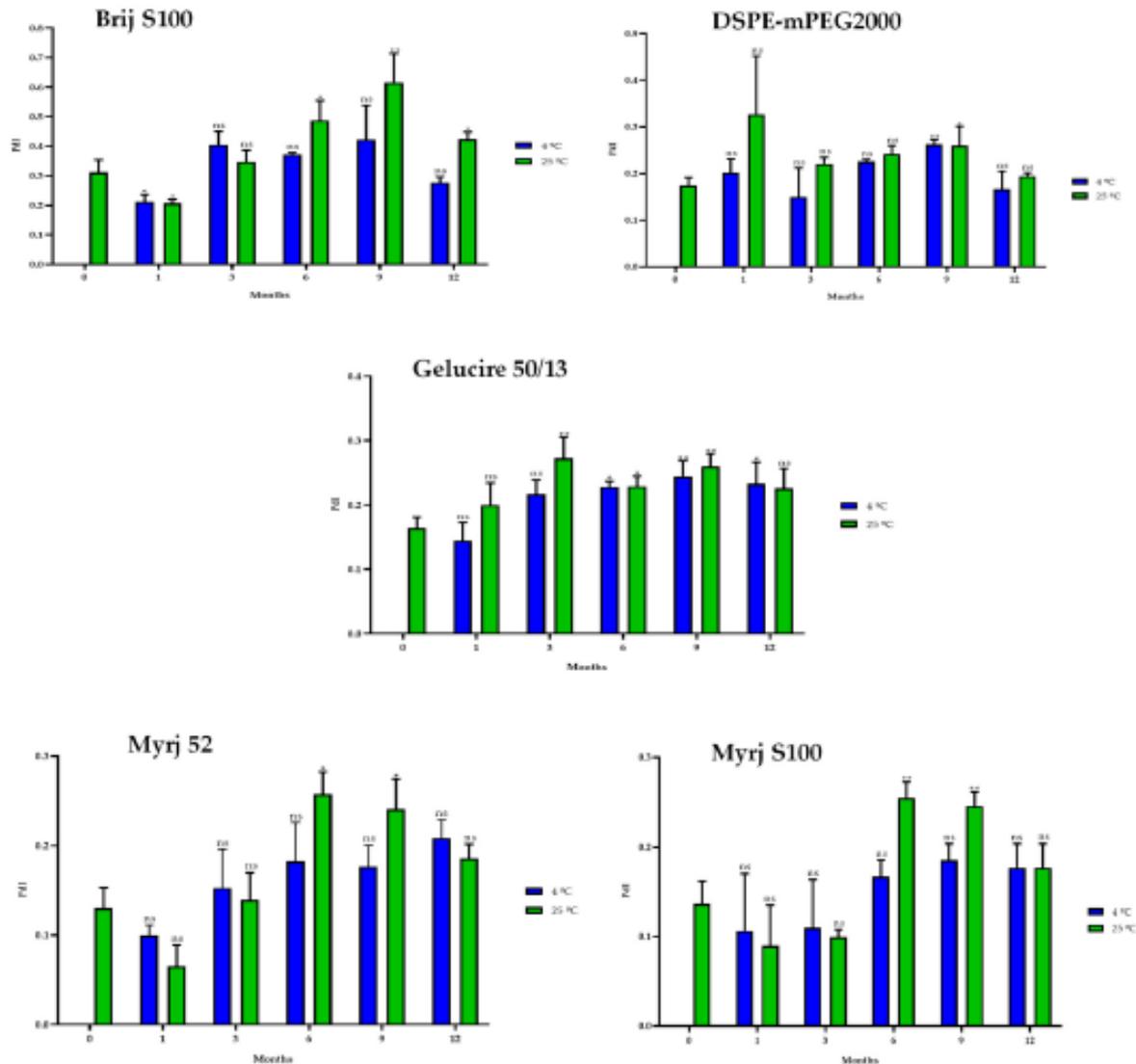


Figure 8. Polydispersity index (PdI) of the five PEGylated nanoparticles over one year at different temperatures (4 °C and 25 °C). Statistical analysis was performed in triplicate. Not significant (ns), * $p = 0.01$ – 0.05 and ** $p = 0.001$ – 0.01 .

Interestingly, in some formulations, freeze-dried PEG-cSLNs exhibited a higher surface charge at 25 °C than at 4 °C (DSPE, Gelucire, Myrj 52 and S100; Figure 10). Nonetheless, all ZP values remained within the required range (25–45 mV) over the elapsed year in all formulations, as confirmed by subsequent biological tests assessing the electrostatic binding of genetic material to the nanoparticles. The purpose of preserving long-term stability and extending the shelf life of nanoparticles was achieved, although the freeze-drying process has not yet been fully standardized and optimized. However, through the improvement of process parameters, it is possible to maintain the integrity of the physicochemical characteristics of the nanoparticles and further enhance their long-term stability.

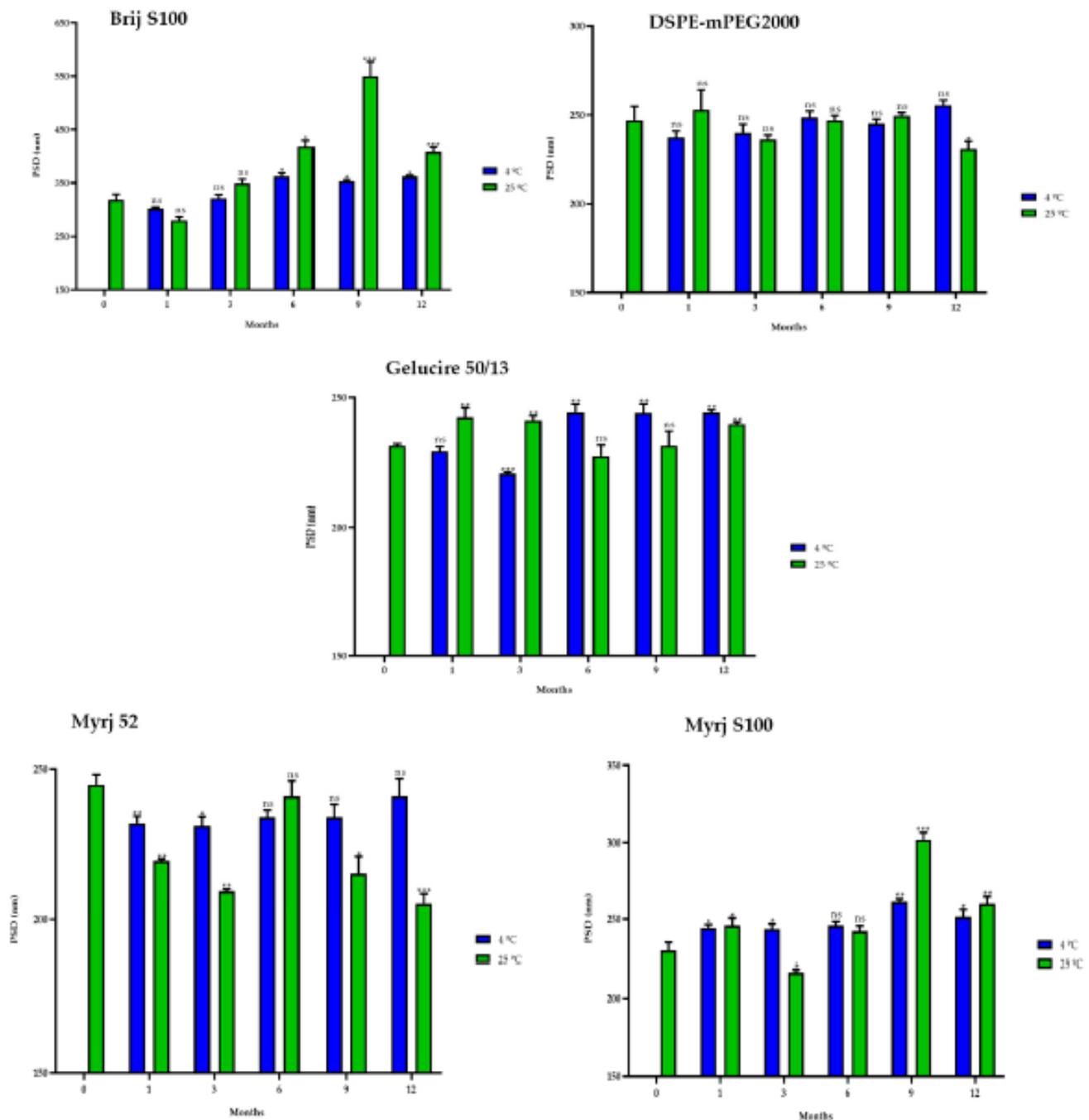


Figure 9. Particle size distribution (PSD) of the five PEGylated nanoparticles over one year at different temperatures (4 °C and 25 °C). Statistical analysis was performed in triplicate. Not significant (ns), * $p = 0.01$ – 0.05 , ** $p = 0.001$ – 0.01 and *** $p < 0.001$.

2.6. Biological Assays

2.6.1. Cytotoxicity of PEG-cSLNs

The effects of the PEG-cSLNs on cellular viability/cytotoxicity were assessed. The results reveal that at a volume of 10 μL , all formulations in both states (suspended and freeze-dried PEG-cSLNs) demonstrated high cell viability, as evidenced by the absence of toxicity toward HEK293T cells in the IP test (Figure 11). In nearly all formulations tested at this volume, cell viability exceeded 90%. These outcomes suggest that under specific

experimental conditions, these PEG-cSLNs do not induce harmful effects on human cells cultured in vitro. Conversely, higher toxicity was observed in practically all formulations when tested at a volume of 20 μL . Interestingly, the freeze-dried formulation with DSPE showed enhanced viability at a volume of 20 μL compared to 10 μL . Notably, Myrj S100 seems to be the most promising formulation, as both states exhibited cell viability over 90% at both tested volumes.

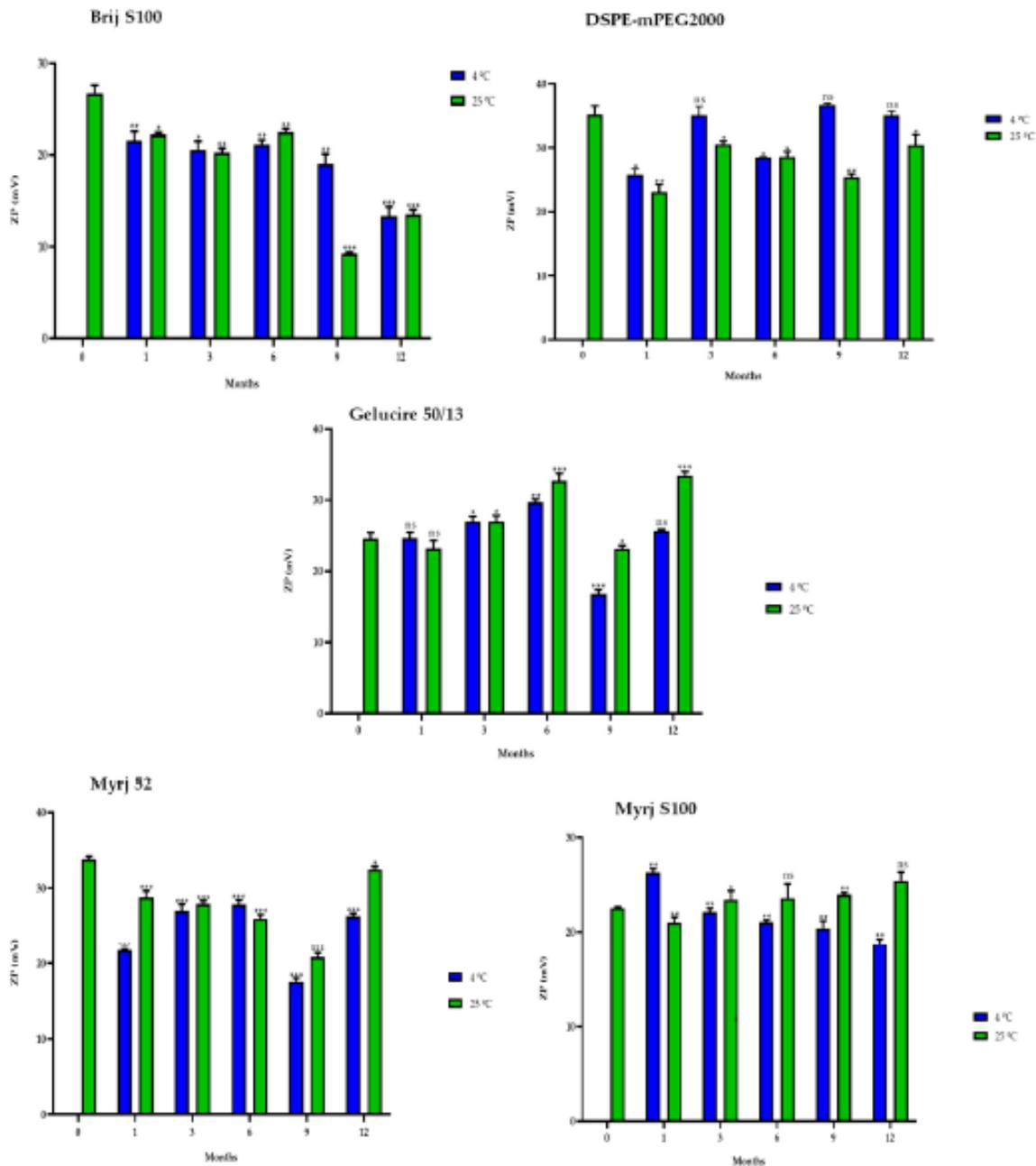


Figure 10. Zeta potential (ZP) of the five PEGylated nanoparticles over one year at different temperatures (4 °C and 25 °C). Statistical analysis was performed in triplicate. Not significant (ns), * $p = 0.01–0.05$, ** $p = 0.001–0.01$ and *** $p < 0.001$.

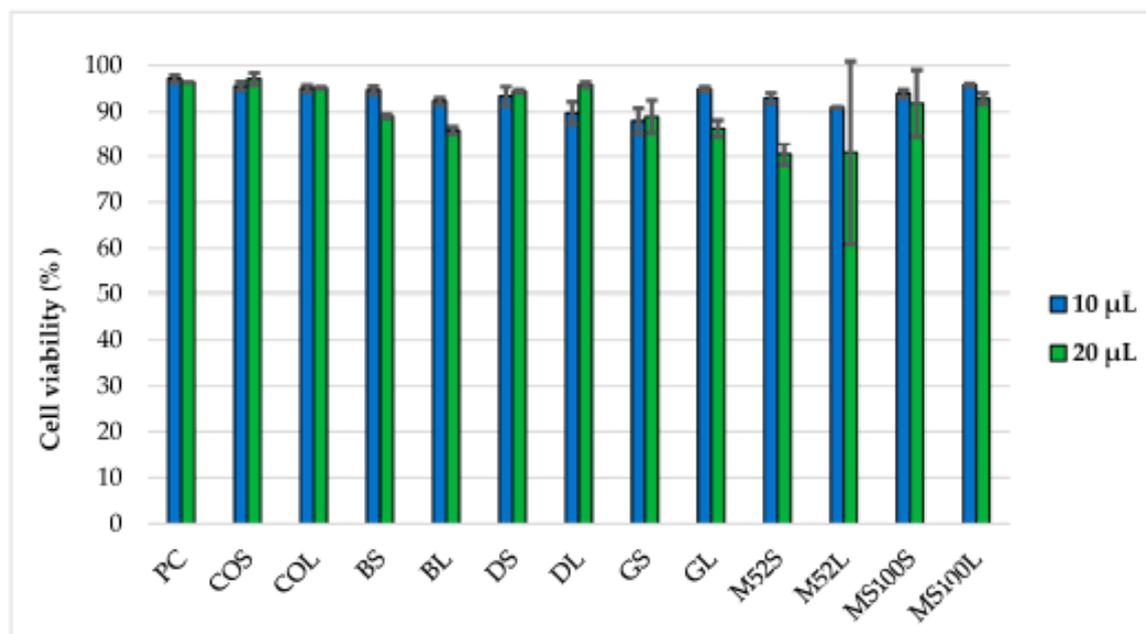


Figure 11. Cell viability of HEK293T cells after 48 h of incubation with two different volumes (10 µL and 20 µL) of PEG-cSLNs in suspended and lyophilized states using flow cytometry. Abbreviations: PC, positive control; COS, cholesteryl oleate suspended; COL, cholesteryl oleate lyophilized; BS, Brij S100 suspended; BL, Brij S100 lyophilized; DS, DSPE suspended; DL, DSPE lyophilized; GS, Gelucire suspended; GL, Gelucire lyophilized; M52S, Myrj 52 suspended; M52L, Myrj 52 lyophilized; MS100S, Myrj S100 suspended; MS100L, Myrj S100 lyophilized.

In vitro biological viability assays of CO-cSLNs have been reported previously [8,25]. To investigate the influence of PEGylation on their in vitro behavior using different PEG excipients, our study aimed to assess the cytotoxicity of these PEG-cSLNs in human cells under specific experimental conditions. The results indicate the absence of cytotoxic effects of these SLNs on human cells, providing a favorable indication to proceed with the formation of complexes with genetic material at a specific volume of nanoparticles.

2.6.2. SLNplex Formation with PEG-cSLNs

To assess the nucleic acid binding efficiency of PEG-cSLNs, gel electrophoresis retardation assays were performed. The presence of unbound free DNA in the gels reflects the binding capacity of the PEGylated nanoparticles (loading efficiency). All PEG-cSLN samples (suspended and freeze-dried SLNs) formed SLNplexes when the amount of DNA was between 0.5 and 1.0 µg (Figure 12). In contrast, PEG-cSLNs were unable to form sufficient complexes with more than 2 µg of DNA, as a considerable amount of free DNA was detected in the gel. Nonetheless, the formulations with suspended SLNs formed complexes in all amounts except for the Myrj S100 formulation.

The capacity of CO-cSLNs to form DNA complexes has been reported previously [24,25]. Our results confirmed the suitability of these PEG-cSLNs for DNA binding, in both their suspended and freeze-dried states, despite the inclusion of PEGylation. While PEGylation reduced the surface charge (ZP), which may have affected the binding capacity, the remaining positive charge was enough to facilitate the formation of SLNplexes in all PEG formulations. Notably, the ZP increased after freeze-drying, improving the ease of SLNplex formation.

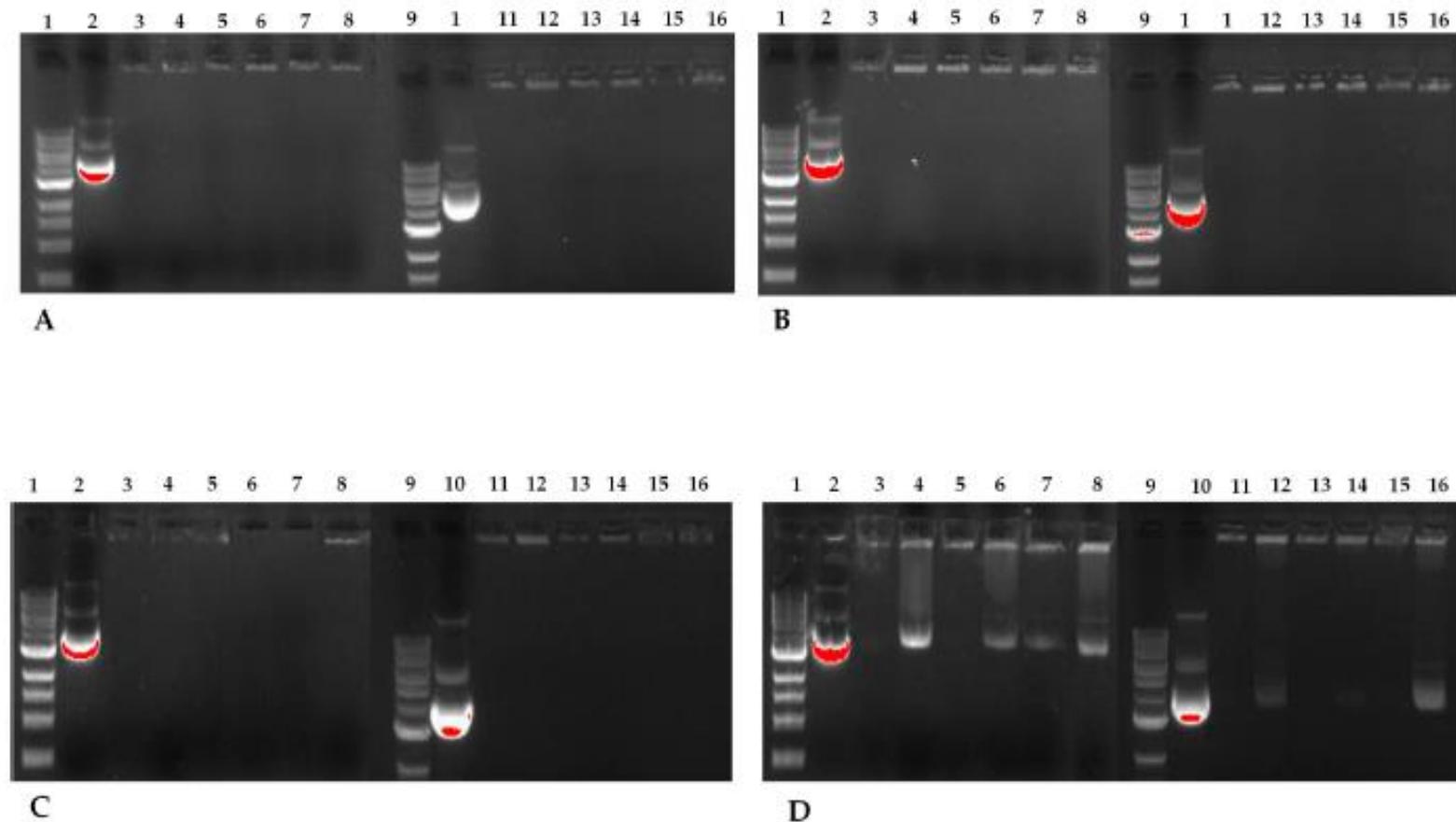


Figure 12. Agarose gel electrophoresis of the five different PEG-cSLNs–DNA complexes in suspended and lyophilized states with increasing amounts of plasmid DNA. Image (A) corresponds to 500 ng of DNA, image (B) to 750 ng, image (C) to 1000 ng, and image (D) to 2000 ng. Lanes 1 and 9: DNA ladder; lanes 2 and 10: MHC luciferase plasmid; lanes 3 and 4: cholesteryl oleate suspended and lyophilized; lanes 5 and 6: DSPE suspended and lyophilized; lanes 7 and 8: Myrj S100 suspended and lyophilized; lanes 11 and 12: Gelucire suspended and lyophilized; lanes 13 and 14: Myrj 52 suspended and lyophilized; lanes 15 and 16: Brij S100 suspended and lyophilized.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

The following materials were used to synthesize the nanoparticles. The lipid matrix was composed of stearic acid (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) and cholesteryl oleate (Tokyo Chemical Industry Co., Tokyo, Japan). Additionally, we selected five different PEGylated excipients: polyoxyethylene (100) stearyl ether- PEG100SE (Brij S100, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA); PEG-32 hydrogenated palm glycerides (Gelucire 50/13, Gattefossé SAS, Saint-Priest, France); polyoxyethylene (40) stearate-PEG 40 monostearate (Myrj 52, Sigma-Aldrich Co); polyoxyethylene (100) stearate-PEG100S (Myrj S100, Croda Iberica S.A., Fogars de la Selva, Spain) and 1,2-distearoyl-phosphatidylethanolamine-methyl-polyethyleneglycol conjugate-2000 (DSPE-mPEG2000, Muse Chem, Fairfield, NJ, USA) for incorporation into the oil phase (dispersed phase) of each formulation after a bibliographic search [18,42–44] and an analysis of their molecular and solubility characteristics, hydrophilic-lipophilic balance, theoretical and experimental compatibility between the components, and price.

The hydrophilic components of the aqueous phase (continuous phase) were poloxamer 188 (Sigma-Aldrich Co.) as a surfactant (100 mg) and octadecylamine (Acros Organics, Geel, Belgium) as the cationic lipid (600 mg) used as a charged carrier. Finally, all the components were mixed with ultrapure water (EMD Millipore).

3.2. Method of Preparation of PEG-cSLNs

A factorial study involving different PEG quantities was conducted to determine the precise composition of the lipid core (stearic acid, SA + cholesteryl oleate, CO + PEG) based on their distinct physicochemical characteristics. The PEG-cSLNs were synthesized using an oil-in-water (o/w) emulsion technique based on the hot microemulsification method [45,46], with certain modifications that involved increasing the duration and the stirring speed within the manufacturing process to reduce particle size. Briefly, all the components were heated and melted at 10 °C above their melting point (~80 °C) in two separate beakers (5 mL and 50 mL) corresponding to the oil and water phases. Once the components of the lipid matrix were melted, they were poured and mixed into the aqueous phase solution (20 mL of ultrapure water + cationic lipid + surfactant) to create a hot emulsion. This mixture was high-speed stirred at 20,000 and 24,000 rpm with a digital ULTRA-TURRAX® IKA® T-25 equipped with a disperser S25N-8 G rotor Ø 8 mm (Staufen, Germany), for 10 and 15 min, respectively.

The hot emulsion obtained was rapidly dispersed into 125 mL of cold water (1–4 °C) under continuous high-speed stirring, employing the same conditions mentioned before, to generate the core solidification that forms the PEG-cSLNs. The resulting microemulsion was centrifuged at 19,000 × g at 4 °C for 20 min (Digicen 20 R, Ortoalresa, Madrid, Spain) to remove any excess excipient. Finally, we double-filtered the nanoparticle suspension through 43–48 µm and 7–9 µm qualitative filter papers, respectively (FILTER-LAB®, Filtros ANOIA, S.A., Barcelona, Spain). The final SLN suspension (~80 mL) was dispensed into 5 mL glass vials (Vidrio Soplado Manuel Pérez, S.A., Barcelona, Spain) and stored at 4 °C until the freeze-drying process began.

3.3. Physicochemical Characterization of the PEG-cSLNs

3.3.1. Size Characterization

The physicochemical properties of both the suspended nanoparticles in an aqueous medium and the reconstituted freeze-dried PEG-cSLNs with 4 mL of Milli-Q water were analyzed. Particle sizes and PDI were determined by means of dynamic light scattering (DLS) with a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) by examining the hydrodynamic particle diameter (z-average), which is expressed as the median volumetric particle diameter [47]. All samples were measured in triplicate to obtain the average nanoparticle size distribution and standard deviation with a mean value calculated in nanometers (nm).

Suspended formulations were characterized on the production day, whereas freeze-dried PEG-cSLNs were stored at 4 °C until further analysis. Measurements were performed at 25 °C and were analyzed in the general-purpose mode corresponding to the specialized software specifying the type of particle and dispersant used.

3.3.2. Zeta Potential Analysis

The surface charge (ZP) of all formulations (aqueous and reconstituted freeze-dried PEG-cSLNs) was measured via laser Doppler electrophoresis in a Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments, Malvern, UK). The zeta potential values were obtained from the electrophoretic mobility (EM) of the nanoparticles under an electric field through electrodes that are connected to the cell containing the sample. Specific software was used to apply the Henry equation to convert the EM of the SLNs into ZP values. Measurements were carried out in triplicate and stabilized at 25 °C before measurement, and the results were expressed in millivolts (mV).

3.4. Effect of PEGylation on the Physicochemical Characteristics of CO-cSLNs

This analysis was designed to assess the impact of PEGylation on three variables (PSD, PDI, and ZP) in cSLNs with PEG. The statistical analysis was performed using the parametric unpaired Student's *t*-test due to the fulfillment of the required conditions (normality test). Additionally, a comparative analysis of the three variables in each formulation was conducted to examine potential differences between the two manufacturing procedures employed. The parametric paired Student's *t*-test was utilized when conditions permitted, while the non-parametric Wilcoxon test was used in cases where the conditions were not met.

3.5. Freeze-Drying of Nanoparticles

3.5.1. Glass Transition Temperature (T_g)

Thermal behavior was conducted using a differential scanning calorimeter (DSC), model 821e (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) before lyophilizing the PEG-cSLNs to establish the appropriate parameters for the process. Samples were weighed out (approx. 30 mg) into aluminum pans (40 µL) and hermetically sealed with aluminum covers. Nitrogen liquid was used to cool down the samples, and an empty aluminum pan was used as a reference. The assay was performed by freezing the samples from 25 °C to −80 °C at 10 °C/min. The sample was kept at this temperature for 1 min and then heated to 25 °C at 10 °C/min. The analyses were conducted within a nitrogen atmosphere (50 mL/min).

3.5.2. Freeze-Drying

The PEG-cSLNs were freeze-dried using a solution of trehalose (5%, *w/v*) as a cryoprotectant on a LyoLab C85 20 (Coolvacuum, Barcelona, Spain) pilot freeze-drying system. Glass vials were placed on the shelf of the freeze-dryer. Each vial was semi-stoppered and contained 4 mL (2 mL of PEG-cSLNs suspension and 2 mL of trehalose solution, 5%), representing each of the five different nanoparticle formulations. Briefly, conventional ramp freezing was carried out, in which the lyophilization cycle consisted of freezing the samples at −55 °C for 2 h. Then, the temperature was increased to −15 °C with a vacuum of 0.30 mbar for 20 h (primary drying), and secondary drying was performed at 25 °C for 20 h. After lyophilization, the PEG-cSLNs were evaluated for the presence of a homogeneous white cake and uniform appearance, indicating successful lyophilization without moisture. The lyophilized powder was reconstituted with 4 mL of Milli-Q water and filtered (43–48 µm) prior to performing the experiments.

3.5.3. Comparison between the Different Conditions after Freeze-Drying

This analysis compared the three variables of each formulation between PEG-cSLNs suspended in aqueous medium and freeze-dried PEG-cSLNs. The analysis was performed using the paired Student's *t*-test when the conditions were met, and the Wilcoxon test otherwise.

3.6. Morphological Analysis of the PEG-cSLNs

The surface and content homogeneity of all nanoparticle formulations (suspended and reconstituted freeze-dried PEG-cSLNs) were analyzed by means of transmission electron microscopy (TEM). Images were taken using a Tecnai Spirit microscope equipped with a LaB6 cathode (FEI Company, Hillsboro, OR, USA). Images were recorded at 120 kV using a 1376 × 1024-pixel CCD Megaview camera. The samples were adsorbed onto carbon-coated copper grids and negatively stained with a 4.0% methylcellulose solution.

3.7. Physical Stability Study

The stability study was carried out by determining the particle size, PDI, and zeta potential values on a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical Ltd., UK) and Nano-Z (Malvern Instruments, UK) for both suspended and reconstituted freeze-dried PEG-cSLNs. Suspended samples were stored at 4 °C and 25 °C for one month, while the lyophilized PEG-cSLNs were stored for one year at the same temperatures mentioned before. For the correlation analysis, Pearson or Spearman tests were performed depending on the normality of the samples.

3.8. Biological Characterization of PEG-cSLNs

3.8.1. Cytotoxicity Assay

Cell cultures were established with human embryonic kidney 293 T (HEK293T) cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The cells were grown and maintained in DMEM with low glucose supplemented with 10% *v/v* heat-inactivated FBS (Life Technologies Corp., Eugene, OR, USA), penicillin/streptomycin, 4 mM L-glutamine, and non-essential amino acids at 37 °C in a 95% air and 5% CO₂ atmosphere as previously described [45].

For the viability/cytotoxicity assays, HEK293T cells were grown in 35 mm plates M6 (Falcon Enamelware, London, UK) to approximately 70–80% confluence. Two different volumes (10 µL and 20 µL) of each PEG-cSLN, in both suspended and freeze-dried states, were incubated with HEK293T cells in duplicate. Cellular cytotoxicity was assessed using flow cytometric analysis with the propidium iodide (PI) test. Briefly, HEK293T cells were seeded in 6-well plates (2.5 × 10⁵ cells/well) and incubated in DMEM supplemented with 10% FBSi at 37 °C for 24 h. The culture medium was removed, the nanoparticles were added to DMEM without antibiotics or FBSi, and the cells were incubated again at 37 °C for 48 h. Flow cytometric analyses were performed with the vital dye PI (40 µg/mL, EMD Millipore) using a FACSCalibur cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A minimum of 10,000 events were acquired by gating the forward and side scatters to exclude cell debris and analyzed in FL-3.

3.8.2. SLNplexes Formation

SLNplexes were prepared by mixing the PEG-cSLNs (10 µL) with different amounts (500 ng, 750 ng, 1000 ng, and 2000 ng) of plasmid DNA (pDNA). The mixture was kept at room temperature (RT) for 40–45 min to allow the complexes to form. The analysis of SLNplex formation and loading efficiency of the PEG-cSLNs with pDNA was performed by examining the electrophoretic mobility of the samples across a 1.0% agarose gel. Gels were made with agarose D-1 at 0.8% in 1× Tris-acetate-EDTA (TAE) (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) containing 0.04 µL/mL RedSafe[®] solution for nucleic acid visualization. An aliquot of each sample was mixed with 6X loading dye (NEB B7025S) comprising 2.5% Ficoll-400, 10 mM EDTA, and 3.3 mM Tris-HCl (pH 8.0–25 °C) and charged into the respective gel well. Electrophoresis was carried out at 80 V for 45 min. The fragments were visualized under UV light using a UV transilluminator GelDoc[®] EZ Imager (Bio-Rad[®], Hercules, CA, USA) system and photographed by Bio-Rad[®] ImageLab 5.2.1 software.

3.9. Statistical Analysis

Three main analyses were carried out to establish whether there were significant differences between the different conditions to which the SLNs were exposed (PEGylation, protocols, nanoparticles suspended in an aqueous medium, and reconstituted freeze-dried nanoparticles). Two batches of each formulation were measured in triplicate to obtain the means and standard deviation of the particle size distribution (PSD), polydispersity index (PDI), and zeta potential (ZP).

All statistical tests and graphs were performed using IBM SPSS Statistics software, version 22 (SPSS, Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism version 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The *p* values are represented by asterisks (* *p* = 0.01–0.05, ** *p* = 0.001–0.01, and *** *p* < 0.001). The absence of an asterisk indicates that the change relative to the control is not statistically significant. The SLNs without PEG represented the control, whose denomination was CO due to cholesteryl oleate.

4. Conclusions

PEGylation and modifications in the manufacturing method affected the physicochemical characteristics of the CO-cSLNs. PEGylation significantly reduced particle size, and the lyophilization process influenced the physicochemical properties of PEG-cSLNs. However, successful reconstitution of PEG-cSLNs was achieved with a monodisperse population and positive surface charge, making them suitable for DNA binding and complex formation.

Furthermore, PEGylation notably improved the stability of suspended CO-cSLNs (more than one month). Most freeze-dried PEG formulations (4 of 5) showed stability for one year. The biological properties of CO-cSLNs remained unaltered by PEGylation, as cell viability remained high (over 90%). The consistent surface charge over time facilitated SLNplex formation, highlighting their potential as non-viral vectors.

Finally, these findings demonstrated the potential of these PEGylated nanoparticles for advancing transfection tests and conducting subsequent *in vivo* assays. The use of cost-effective PEGs could further enhance their commercial accessibility, making them promising candidates for future biomedical applications.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph16111583/s1>, Table S1: Measurements of the glass transition temperature (*T*_g) of each developed PEG formulation; Figure S1: DSC analysis of the four PEG-cSLNs suspended in a solution with 5% of trehalose. Brij S100 (A), Gelucire (B), Myrj 52 (C), and Myrj S100 (D); Table S2: Correlations and regressions between the physicochemical characteristics (PDI, PSD, and ZP) of suspended cSLNs and the elapsed time (30 days) of each PEG formulation at two temperatures (4 °C and 25 °C) exposed; Table S3: Correlations and regressions between the physicochemical characteristics (PDI, PSD, and ZP) of lyophilized cSLNs and the elapsed time (one year) of each PEG formulation at two temperatures (4 °C and 25 °C) exposed.

Author Contributions: Conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, data curation, visualization, writing—original draft and writing—review and editing, D.A.N.-N.; methodology, validation and formal analysis, M.D.-R., S.J.-L. and C.M.-C.; investigation, R.V.; funding acquisition and resources, A.N.-R., E.G.-M., P.P.-L., J.M.S.-N. and C.H.-M.; writing—review and editing, supervision, funding acquisition and project administration, C.S.; conceptualization, methodology, visualization, writing—review and editing, supervision, funding acquisition and project administration, M.S.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by MCIN/AEI/PID2020-118859GB-I00, the Andalusian Government grants P20_01269 and P20_01271, the Department of Research and Universities of Catalunya (AGAUR 2021 SGR 01068) and ERDF A way of making Europe.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented supporting the conclusions established in this study are available within this article.

Acknowledgments: We would like to thank Maria Antonia Busquets for her assistance in providing the resources and equipment necessary to determining particle size distribution and polydispersity index. We thank the staff of the Electronic Criomicroscopy Unit (CCIT-UB) and the Thermal Analysis and Calorimetry Service (IQAC-CSIC) for their support and technical assistance whenever we required it. Finally, special thanks go to Adriana Valdez Narváez for her effort and contribution in preparing the graphical abstract.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Geszke-Moritz, M.; Moritz, M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *68*, 982–994. [CrossRef] [PubMed]
2. Paunovska, K.; Loughrey, D.; Dahlman, J.E. Drug delivery systems for RNA therapeutics. *Nat. Rev. Genet.* **2022**, *23*, 265–280. [CrossRef] [PubMed]
3. Qiao, Q.; Liu, X.; Yang, Y.; Cui, K.; Kong, L.; Yang, C.; Zhang, Z. Nanomedicine for acute respiratory distress syndrome: The latest application, targeting strategy, and rational design. *Acta Pharm. Sin. B* **2021**, *11*, 3060–3091. [CrossRef]
4. De Jesus, M.B.; Zuhom, I.S. Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: Properties and molecular mechanisms. *J. Control Release* **2015**, *201*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
5. dos Santos Coura, R.; Nardi, N.B. A role for adeno-associated viral vectors in gene therapy. *Genet. Mol. Biol.* **2008**, *31*, 1–11. [CrossRef]
6. Hanlon, K.S.; Kleinstiver, B.P.; Garcia, S.P.; Zaborowski, M.P.; Volak, A.; Spirig, S.E.; Muller, A.; Sousa, A.A.; Tsai, S.Q.; Bengtsson, N.E.; et al. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4439. [CrossRef] [PubMed]
7. Takada, R.K.; Maheshwari, R.; Tekade, M.; Chougule, M.B. Solid lipid nanoparticles for targeting and delivery of drugs and genes. In *Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 256–286. ISBN 9780128097182.
8. Suñé-Pou, M.; Prieto-Sánchez, S.; El Yousfi, Y.; Boyero-Corral, S.; Nardi-Ricart, A.; Nofreñas-Roig, I.; Pérez-Lozano, P.; García-Montoya, E.; Miñarro-Carmona, M.; Tico, J.R.; et al. Cholesteryl oleate-loaded cationic solid lipid nanoparticles as carriers for efficient gene-silencing therapy. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 3223–3233. [CrossRef] [PubMed]
9. Kulkarni, J.A.; Cullis, P.R.; Van Der Meel, R. Lipid nanoparticles enabling gene therapies: From concepts to clinical utility. *Nucleic Acid Ther.* **2018**, *28*, 146–157. [CrossRef]
10. Rotshild, V.; Hirsh-Racah, B.; Miskin, I.; Muszkat, M.; Matok, I. Comparing the clinical efficacy of COVID-19 vaccines: A systematic review and network meta-analysis. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 22777. [CrossRef]
11. Kalaycioglu, G.D.; Aydogan, N. Preparation and investigation of solid lipid nanoparticles for drug delivery. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, *510*, 77–86. [CrossRef]
12. Suñé-Pou, M.; Limeiras, M.J.; Moreno-Castro, C.; Hernández-Munain, C.; Suñé-Negre, J.M.; Cuestas, M.L.; Suñé, C. Innovative therapeutic and delivery approaches using nanotechnology to correct splicing defects underlying disease. *Front. Genet.* **2020**, *11*, 731. [CrossRef] [PubMed]
13. Ganesan, P.; Narayanasamy, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustain. Chem. Pharm.* **2017**, *6*, 37–56. [CrossRef]
14. Severino, P.; Szymanski, M.; Favaro, M.; Azzoni, A.R.; Chaud, M.V.; Santana, M.H.A.; Silva, A.M.; Souto, E.B. Development and characterization of a cationic lipid nanocarrier as non-viral vector for gene therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *66*, 78–82. [CrossRef] [PubMed]
15. Rodenak-Kladniew, B.; Islan, G.A.; de Bravo, M.G.; Durán, N.; Castro, G.R. Design, characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *154*, 123–132. [CrossRef]
16. Rompicharla, S.V.K.; Bhatt, H.; Shah, A.; Komanduri, N.; Vijayasathy, D.; Ghosh, B.; Biswas, S. Formulation optimization, characterization, and evaluation of in vitro cytotoxic potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles for improved anticancer activity. *Chem. Phys. Lipids* **2017**, *208*, 10–18. [CrossRef]
17. Alnylam Pharmaceuticals RNAi Therapeutics | Our Approved Products | Alnylam@Pharmaceuticals. Available online: <https://www.alnylam.com/our-products> (accessed on 7 July 2023).
18. Ban, C.; Jo, M.; Lim, S.; Choi, Y.J. Control of the gastrointestinal digestion of solid lipid nanoparticles using PEGylated emulsifiers. *Food Chem.* **2018**, *239*, 442–452. [CrossRef]
19. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U.S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives. *Angew. Chemie-Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288–6308. [CrossRef]
20. Schoenmaker, L.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J.A.; Verbeke, R.; Kersten, G.; Jiskoot, W.; Crommelin, D.J.A. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int. J. Pharm.* **2021**, *601*, 120586. [CrossRef]

21. Ngamcherdtrakul, W.; Sangvanich, T.; Reda, M.; Gu, S.; Bejan, D.; Yantasee, W. Lyophilization and stability of antibody-conjugated mesoporous silica nanoparticle with cationic polymer and PEG for siRNA delivery. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 4015. [\[CrossRef\]](#)
22. Yoo, J.-W.; Chambers, E.; Mitragotri, S. Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: Challenges, solutions and future prospects. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 2298–2307. [\[CrossRef\]](#)
23. Evers, M.J.W.; Kulkarni, J.A.; van der Meel, R.; Cullis, P.R.; Vader, P.; Schifffers, R.M. State-of-the-art design and rapid-mixing production techniques of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery. *Small Methods* **2018**, *2*, 1700375. [\[CrossRef\]](#)
24. Suñé-Pou, M.; Limeres, M.J.; Nofrerias, I.; Nardi-Ricart, A.; Prieto-Sánchez, S.; El-Yousfi, Y.; Pérez-Lozano, P.; Garcia-Montoya, E.; Miñarro-Carmona, M.; Ticó, J.R.; et al. Improved synthesis and characterization of cholesteryl oleate-loaded cationic solid lipid nanoparticles with high transfection efficiency for gene therapy applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *180*, 159–167. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Limeres, M.; Suñé-Pou, M.; Prieto-Sánchez, S.; Moreno-Castro, C.; Nusblat, A.; Casrto, G.; Su, C. Development and characterization of an improved formulation of cholesteryl oleate-loaded cationic solid-lipid nanoparticles as an efficient non-viral gene delivery system. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *184*, 110533. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Trenkenschuh, E.; Savšek, U.; Friess, W. Formulation, process, and storage strategies for lyophilizates of lipophilic nanoparticulate systems established based on the two models paliperidone palmitate and solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2021**, *606*, 120929. [\[CrossRef\]](#)
27. Quintanar-Guerrero, D.; Fessi, H.; Allemann, E.; Doelker, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.* **1996**, *143*, 133–141. [\[CrossRef\]](#)
28. Paliwal, R.; Babu, R.J.; Palakurthi, S. Nanomedicine scale-up technologies: Feasibilities and challenges. *AAPS PharmSciTech* **2014**, *15*, 1527–1534. [\[CrossRef\]](#)
29. Colombo, A.P.; Briançon, S.; Lieto, J.; Fessi, H. Project, design, and use of a pilot plant for nanocapsule production. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2001**, *27*, 1063–1072. [\[CrossRef\]](#)
30. Trenkenschuh, E.; Friess, W. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *165*, 345–360. [\[CrossRef\]](#)
31. Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 57. [\[CrossRef\]](#)
32. Barua, S.; Mitragotri, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today* **2014**, *9*, 223–243. [\[CrossRef\]](#)
33. Luo, W.C.; O'Reilly Beringhs, A.; Kim, R.; Zhang, W.; Patel, S.M.; Bogner, R.H.; Lu, X. Impact of formulation on the quality and stability of freeze-dried nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2021**, *169*, 256–267. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Wang, J.L.; Hanafy, M.S.; Xu, H.; Leal, J.; Zhai, Y.; Ghosh, D.; Williams, R.O.; David Charles Smyth, H.; Cui, Z. Aerosolizable siRNA-encapsulated solid lipid nanoparticles prepared by thin-film freeze-drying for potential pulmonary delivery. *Int. J. Pharm.* **2021**, *596*, 120215. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Kim, B.; Hosn, R.R.; Remba, T.; Yun, D.; Li, N.; Abraham, W.; Melo, M.B.; Cortes, M.; Li, B.; Zhang, Y.; et al. Optimization of storage conditions for lipid nanoparticle-formulated self-replicating RNA vaccines. *J. Control. Release* **2023**, *353*, 241–253. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Shirane, D.; Tanaka, H.; Nakai, Y.; Yoshioka, H.; Akita, H. Development of an alcohol dilution-lyophilization method for preparing lipid nanoparticles containing encapsulated siRNA. *Biol. Pharm. Bull.* **2018**, *41*, 1291–1294. [\[CrossRef\]](#)
37. Hinrichs, W.L.J.; Manceñido, F.A.; Sanders, N.N.; Braeckmans, K.; De Smedt, S.C.; Demeester, J.; Frijlink, H.W. The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying. *Int. J. Pharm.* **2006**, *311*, 237–244. [\[CrossRef\]](#)
38. Endres, T.; Zheng, M.; Beck-Broichsitter, M.; Kissel, T. Lyophilised ready-to-use formulations of PEG-PCL-PEI nano-carriers for siRNA delivery. *Int. J. Pharm.* **2012**, *428*, 121–124. [\[CrossRef\]](#)
39. Wu, J. The enhanced permeability and retention (EPR) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 771. [\[CrossRef\]](#)
40. Bahari, L.A.S.; Hamishehkar, H. The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers; A comparative literature review. *Adv. Pharm. Bull.* **2016**, *6*, 143–151. [\[CrossRef\]](#)
41. Song, L.; Guo, Y.; Roebuck, D.; Chen, C.; Yang, M.; Yang, Z.; Sreedharan, S.; Glover, C.; Thomas, J.A.; Liu, D.; et al. Terminal PEGylated DNA-gold nanoparticle conjugates offering high resistance to nuclease degradation and efficient intracellular delivery of DNA binding agents. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 18707–18716. [\[CrossRef\]](#)
42. Dhiman, S.; Mishra, N.; Sharma, S. Development of PEGylated solid lipid nanoparticles of pentoxifylline for their beneficial pharmacological potential in pathological cardiac hypertrophy. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2015**, *44*, 1901–1908. [\[CrossRef\]](#)
43. Pignatello, R.; Leonardi, A.; Pellitteri, R.; Carbone, C.; Caggia, S.; Graziano, A.C.E.; Cardile, V. Evaluation of new amphiphilic PEG derivatives for preparing stealth lipid nanoparticles. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *434*, 136–144. [\[CrossRef\]](#)
44. Chuang, C.H.; Wu, P.C.; Tsai, T.H.; Fang, Y.P.; Tsai, Y.H.; Cheng, T.C.; Huang, C.C.; Huang, M.Y.; Chen, F.M.; Hsieh, Y.C.; et al. Development of pH-sensitive cationic PEGylated solid lipid nanoparticles for selective cancer-targeted therapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2017**, *13*, 192–203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Fábregas, A.; Sánchez-Hernández, N.; Tico, J.R.; Garcia-Montoya, E.; Pérez-Lozano, P.; Suñé-Negre, J.M.; Hernández-Munain, C.; Suñé, C.; Miñarro, M. A new optimized formulation of cationic solid lipid nanoparticles intended for gene delivery: Development, characterization and DNA binding efficiency of TCERG1 expression plasmid. *Int. J. Pharm.* **2014**, *473*, 270–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Vighi, E.; Ruczi, B.; Montanari, M.; Battini, R.; Leo, E. pDNA condensation capacity and in vitro gene delivery properties of cationic solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2010**, *389*, 254–261. [[CrossRef](#)]
47. Wiemann, S.; Keck, C.M. Are lipid nanoparticles really superior? A holistic proof of concept study. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2022**, *12*, 1433–1444. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

ANEXO II

Development of PEGylated Solid Lipid Nanoparticles as Vectors for Gene Therapy

David A. Narváez-Narváez¹; Marc Suñé-Pou¹; Cristina Moreno-Castro²; Anna Nardi-Ricart¹; Débora Mercadé-Frutos¹; Encarna García-Montoya¹; Pilar Pérez-Lozano¹; Cristina Hernández-Munain³; Josep M. Suñé-Negre¹; Carlos Suñé²

1. Departments of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona, Spain, dnavana20@alumnos.ub.edu
2. Department of Molecular Biology, Institute of Parasitology and Biomedicine "López Neyra" (IPBLN-CSIC), PTS, 18016 Granada, Spain.
3. Department of Cell Biology and Immunology, Institute of Parasitology and Biomedicine "López Neyra" (IPBLN-CSIC), PTS, 18016 Granada, Spain.

Introduction

In the last 30 years, **nanotechnology** has become a novel interdisciplinary scientific field, which has promoted the development of various **nanostuctures** with the potential to provide controlled drug release and targeted administration of active agents. Along with the development of new and efficient technologies, it has allowed us to raid into the improvement of therapies such as **gene therapy**. In this regard, solid lipid nanoparticles (**SLN**) are gaining more importance, being one of the most promising nanoparticle-based methods for gene therapy. Cationic solid-lipid nanoparticles (**cSLNs**) are nanoparticles based on biocompatible and biodegradable lipids with a positive surface charge capable of forming complexes with DNA/RNA (**SLNplexes**).

Starting from already established formulations of cSLNs with cholesteryl-oleate that have demonstrated their efficacy and safety *in vitro* (Suñé-Pou et al., 2019), this project aims to improve the current formulation for the possible administration of RNA/DNA *in vivo*, with the incorporation in the nanostructures of excipients, for instance, polyethylene glycol (**PEG**), that present protein repellent properties, and can also "mask" the nanoparticles from the host's immune system, thus reducing immunogenicity. The overarching goal of this study is to develop effective nanoparticle systems for the successful administration of nucleic acids *in vitro* and especially *in vivo* systems so that in the future this tool can be implemented in the nanomedicine field. In this poster, the physicochemical and biological characteristics of **five different** formulations incorporating different types of PEG excipients will be presented and compared.

Materials & Methods

Nanoparticles were synthesized using: poloxamer 188, octadecylamine, stearic acid, cholesteryl oleate, ultrapure water, and five different PEGylated excipients.

Oil-in-water emulsion technique based on the hot microemulsification method was used.

Particle size and polydispersity index (PDI) was determined by dynamic light scattering on a Zetasizer Nano ZS9. Zeta-potential was measured by laser Doppler microelectrophoresis in a Zetasizer Nano-Z.

For the cytotoxicity assays, HEK293T cells were grown in 35 mm plates with DMEM medium to approximately 70–80 % confluence. Pictures were taken at 24 h and 48 h after having added different volumes of PEG-SLNs (0–25 μ L). The cytotoxicity assay was carried out using flow cytometric analysis with the propidium iodide (PI) test.

SLNplexes were prepared by mixing the PEG-SLNs (15 μ L) with different amount of plasmid DNA (pDNA). The analysis of SLNplexes formation and loading efficiency of the PEG-SLNs with pDNA was performed by electrophoretic mobility of the samples on 1.0% agarose gels.

Results

➤ An **important population** of small and homogeneous nanoparticles in all the formulations was obtained. Particle size, was determined several times, and a size of 181 ± 11 nm was achieved. PDI values were lower than 0.2 (0.14 ± 0.05), and zeta potential showed a positive surface ($+25.08 \pm 2.71$) (**Table 1**).

➤ Different volumes of each PEG-SLNs were incubated with HEK293T cells for 24 and 48 h. Toxic effects were observed in a volume of **20 μ L** of each PEG-SLNs sample. Propidium iodide staining corroborated these results, in where the cell viability decreased about 65% (**Figure 1**).

➤ Gel electrophoresis retardation assays were performed to assess the nucleic acid binding efficiency of the PEG-SLNs. **Almost all** PEG-SLNs samples formed SLNplexes when the amount of DNA was between 0.5 and 1.0 μ g (**Figure 2**). However, even in the initial volume, DSPE could not form enough SLNplexes as there were fewer PEG-SLNs.

Table 1. Particle size, Pdi, and zeta potential of the five different PEG-SLNs.

PEG-SLNs	Particle size (nm)	Pdi	Zeta potential (mV)
Brij S100	180,8	0,117	23
DSPE	164,3	0,216	21,8
Gelucire 50/13	178,6	0,158	28,6
Myrj 52	185,6	0,141	25,7
Myrj S10	193,8	0,086	26,3

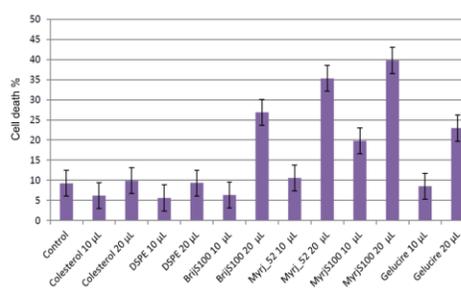


Figure 1. Cytotoxicity assay of the five different PEG-SLNs with HEK293T cells through flow cytometry with propidium iodide (PI) test.

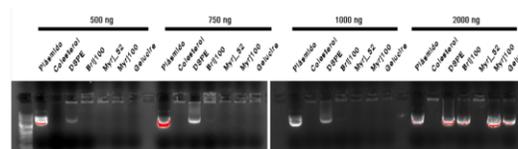


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of the five different PEG-SLNs:DNA complexes with increasing amounts of plasmid DNA (500–2000 ng).

Conclusions

- An adequate population of PEG-SLNs without formation of aggregates and with an acceptable particle size (nm) and zeta potential (mV) was obtained.
- PEG-SLNs were toxic to cells in volumes greater than 20 μ L.
- Our results confirmed the suitability of these PEG-SLNs to bind DNA and form complexes.
- With these preliminary results, and to ensure that the PEG-SLNs can enter the cell, we will improve the formulation to reduce the particle size to a cut-off value of 100 nm.
- Once we reduce the size of PEG-SLNs, we will proceed to perform transfection experiments to continue with the *in vivo* assays.

References

1. Suñé-Pou M, Limeres MJ, Nofrerías I, Nardi-Ricart A, Prieto-Sánchez S, El-Yousfi Y, Pérez-Lozano P, García-Montoya E, Miñarro-Carmona M, Tico JR, et al. Improved synthesis and characterization of cholesteryl oleate-loaded cationic solid lipid nanoparticles with high transfection efficiency for gene therapy applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 180:159–167 (2019).

Effect of Temperature, Vacuum, and Process Duration on the Freeze-Dry of PEGylated Solid Lipid Nanoparticles

David A. Narváez-Narváez¹; Ronny Vargas¹; Anna Nardi-Ricart¹; Encarna Garcia-Montoya¹; Pilar Pérez-Lozano¹; Josep M^a Suñé-Negre¹; Cristina Hernández-Munain²; Carlos Suñé²; Marc Suñé-Pou¹

1. University of Barcelona, Avda. Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona, Spain, dnavana20@alumnes.ub.edu*

2. Institute of Parasitology and Biomedicine "López Neyra" (IPBLN-CSIC), PTS, 18016 Granada, Spain.

Introduction

In the last three decades, the development of several **nanostuctures** with the potential to provide controlled drug release and targeted delivery of active agents has gained great interest. Thus, the use of nanoparticles (NPs) has become a promising tool to establish new therapeutic routes for clinical use, such as **gene and RNA therapies**. For instance, cationic solid lipid nanoparticles (**cSLNs**) are biodegradable and biocompatible non-viral lipid-based nanoparticles with a positive surface charge, capable of forming SLN complexes (**SLNplexes**) with DNA/RNA.

In this sense, one of the great challenges in the field is to achieve adequate **colloidal stability** of NPs over time. To achieve this goal, the **freeze-drying process** is the main technique used, since NP-based formulations are currently available in liquid suspensions and require very cold temperatures to prevent particle aggregation and/or fusion (**COVID-19 vaccines**), which limits its transportation and storage [1]. However, the lyophilization cycle (freezing, primary drying, and secondary drying) generates **stressful conditions** for NPs, especially the freezing step, which drastically affects their physicochemical properties, such as particle size and polydispersity index.

This study seeks to evaluate the effect of temperature, vacuum, and process duration on two different **PEGylated cSLNs** based on cholesteryl-oleate matrix core, which have demonstrated their efficacy and safety *in vitro* [2] and thus develop an optimal, reproducible, and successful freeze-drying process.

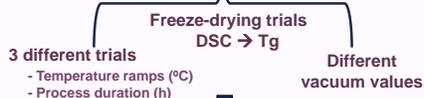
Results and Discussion

- The results showed that the **optimization and standardization** of the freeze-drying process are crucial to avoid irreversible SLNs aggregation. The adjustment of the several parameters that the process has, is very important to **protect** the nanoparticles from both the low temperatures and the extreme vacuum that freeze-drying requires (**Table 1**).
- We performed a **quick freezing** in the three temperature ramps carried out with the two PEG-cSLNs to avoid ice crystal formation due that the most **aggressive step** in the process is freezing.
- The implementation of **temperature ramps** in the primary drying (the most transcendental step) contributes to avoid the nanoparticle agglomeration and therefore the increase in particle size (**Figure 1**). The glass transition temperature (**Tg**) of the samples must be known since it is recommended that the temperature established in the primary drying be **below Tg**.
- The parameters of the **temperature ramp #3** resulted in being the most suitable procedure to lyophilize the SLNs. This ramp with a vacuum of **0,3 mbar** proved to be the **best freeze-drying cycle** to maintain the physicochemical properties of the SLNs similar to those in suspension (**Figure 2**).

Materials & Methods

Nanoparticles were synthesized using: poloxamer 188, octadecylamine, stearic acid, cholesteryl oleate, ultrapure water, and two different PEGylated excipients (Myrj 52 and Tefose 1500).

Oil-in-water emulsion technique based on the hot microemulsification method was used. SLNs were freeze-dried using a trehalose solution (5%, w/v) as a cryoprotectant.



The physicochemical properties of both suspended and freeze-dried SLNs were analyzed. Particle size (PSD) and polydispersity index (Pdl) were determined by dynamic light scattering on a Zetasizer Nano ZS9. Zeta-potential was measured by laser Doppler microelectrophoresis in a Zetasizer Nano-Z.

Table 1. Polydispersity index (Pdl), particle size (Size), zeta potential (ZP), and size difference (Diff. S) between the suspended (S) SLNs vs. unfiltered (UF) and filtered (F) SLNs of PEG Tefose 1500.

PEG	Vacuum (mbar)	SLNs	Pdl	Size (nm)	ZP (mV)	Diff. S vs. UF/F
Tefose 1500	0,3	S	0,184	196,4	34	
		UF	0,321	203,3	NA	6,9
		F	0,217	196,4	44,8	0



Figure 1. Freeze-drying graph of ramp #3. Product 3 and Product 2 correspond to both PEGs: Myrj 52 and Tefose 1500 respectively. Freezing (-55 °C, 2 h), Primary drying (-45 °C, 2 h; -40 °C, 2 h; -35 °C, 2 h; -30 °C, 12 h; -15 °C, 8 h), vacuum (0,3 mbar), Secondary drying (25 °C, 16 h).

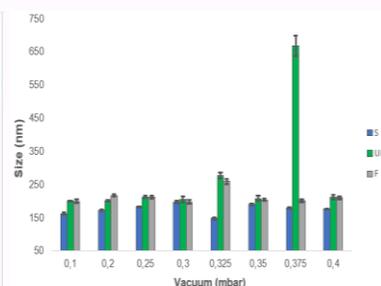


Figure 2. Vacuum effect on the mean size of the SLNs with PEG Tefose 1500 at different pressures. The blue bars indicate SLNs suspended in water; the green bars indicate SLNs unfiltered; the grey bars indicate SLNs filtered.

Conclusions

- Although a freeze-drying cycle was established that was effective in obtaining resuspended SLNs with acceptable physicochemical characteristics, it was not possible to correctly resuspend the lyophilized nanoparticles, and both PEG formulations had to be filtered (43–48 μm filter papers) to remove any agglomerates that might exist.
- The optimization of the lyophilization process is not yet fully standardized, so more trials are needed, for example, testing different types of cryoprotectants and/or lyoprotectants, as well as different concentrations, to better protect the SLNs against the process stress, and thus obtain quality freeze-dry results without filtering the NPs.

References

- [1] Luo WC, O'Reilly Beringsh A, Kim R, Zhang W, P, et al. Eur J Pharm Biopharm. 2021;169:256–67.
- [2] Suñé-Pou M, Limeres MJ, Nofreñas I, Nardi-Ricart A, et al. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2019;180:159–67.



ANEXO III

Tabla S1. Variación de cantidades de PEG evaluadas en un diseño factorial para determinar la cantidad óptima a utilizar.

Excipiente	Cantidades mg			
	180	140	100	60
Ac. Esteárico	180	140	100	60
Colesterol	270	210	150	90
PEG	50	150	250	350

Tabla S2. Variación de cantidades de cistamina evaluadas en un diseño factorial para determinar la cantidad óptima a utilizar.

Excipiente	Cantidades mg			
	119	112	98	84
Ac. Esteárico	119	112	98	84
Colesterol	179	168	147	126
PEG	128	120	105	90
Cistamina	75	100	150	200

Tabla S3. Comparación del tamaño de partícula (PSD) y Pdl entre nanopartículas suspendidas en medio acuoso sin liofilizar, liofilizadas sin filtrar y liofilizadas filtradas con dos PEGs distintos sometidos a diferentes vacíos.

Vacío	SLNs ^a	PSD (nm) ^b		Pdl ^c	
0.1	S	161.1 ^d	161.4 ^e	0.189 ^d	0.173 ^e
	SF	192.7	199.7	0.199	0.238
	F	207	198.7	0.215	0.221
0.2	S	176	171.2	0.133	0.156
	SF	209.1	200.4	0.219	0.232
	F	210.9	215.8	0.158	0.241
0.25	S	184.5	181.4	0.116	0.154
	SF	205.7	211.8	0.204	0.255
	F	234.1	211	0.241	0.211
0.325	S	198.3	147	0.185	0.201
	SF	426.3	276	0.678	0.317
	F	202	258	0.234	0.312
0.35	S	197.5	189.4	0.167	0.137
	SF	200.3	207.2	0.216	0.258
	F	203.1	202.4	0.205	0.212
0.375	S	220.4	178.3	0.171	0.178
	SF	244.7	667.4	0.229	0.295
	F	266.9	199.2	0.232	0.255
0.4	S	182.6	175.4	0.142	0.182
	SF	211.5	210.7	0.206	0.224
	F	222.1	209.2	0.227	0.191

^a Nanopartículas suspendidas sin liofilizar (S), liofilizadas sin filtrar (SF) y liofilizadas filtradas (F).

^b Distribución del tamaño de partícula (PSD).

^c Índice de polidispersidad (Pdl)

^d Formulación correspondiente al PEG Myrij 52.

^e Formulación correspondiente al PEG Tefose 1500.

Tabla S4. Comparación de las características fisicoquímicas entre nanopartículas suspendidas en medio acuoso sin liofilizar, liofilizadas sin filtrar y liofilizadas filtradas con tres PEGs distintos sometidas a diferentes crioprotectores con diferentes concentraciones.

PEG	Crioprotector ^a	PSD (nm) ^b	Pdl	ZP (mV)
Tefose 1500	SLNs suspendidas	0.229	210.4	41.8
	Trehalosa	0.325	291.5	39.7
	Sucralosa	0.269	284.1	34.9
	Sacarosa	0.383	246	40.5
Tefose 63	SLNs suspendidas	0.209	206.7	56.1
	Trehalosa	0.293	281	49.8
	Sucralosa	0.277	242	51.6
	Sacarosa	0.255	296.8	36.6
Myrj S100	SLNs suspendidas	0.164	214.1	35.9
	Trehalosa	0.261	386.6	36.3
	Sucralosa	0.342	375.4	30.4
	Sacarosa F	0.139	253.2	32.7
	Sacarosa SF	0.237	264.1	
Tefose 1500	SLNs suspendidas	0.19	218.9	48.4
	Sac 5 %	0.377	295.9	48.4
	Sac 10 %	0.365	361.5	
	Sac 15 %	0.279	255.1	
	Sac 20 % SF	0.253	217.3	
	Sac 20 % F	0.261	314.5	
Tefose 63	SLNs suspendidas	0.2	216	
	Sac 5 %	0.292	231.3	49.6
	Sac 10 %	0.33	239.9	45
	Sac 15 %	0.241	274.2	45.6
	Sac 20 % SF	0.072	244.2	
	Sac 20 % F	0.145	284.1	
Myrj S100	SLNs suspendidas	0.137	217.9	
	Sac 5 %	0.136	309.8	
	Sac 10 %	0.827	626.9	
	Sac 15 %	0.231	302.1	
	Sac 20 % SF	0.204	262.4	
	Sac 20 % F	0.241	307.3	28.8
Tefose 1500	SLNs suspendidas	0.21	228.9	
	Sac 25 % SF	0.097	217.9	
	Sac 25 % F	0.184	240.8	12.2
	Sac 30 % SF	0.193	243.7	
	Sac 30 % F	0.423	376.8	
Tefose 63	SLNs suspendidas	0.207	229.6	
	Sac 25 % SF	0.059	228.4	
	Sac 25 % F	0.124	260.4	18.8
	Sac 30 % SF	0.214	253.7	
	Sac 30 % F	0.225	249.8	20.8

Tabla S4. Continúa.

PEG	Crioprotector ^a	PSD (nm)	Pdl ^b	ZP (mV)
Myrj S100	SLNs suspendidas	222.6	0.161	
	Sac 25 % SF	243.5	0.165	
	Sac 25 % F	194.2	0.069	13.5
	Sac 30 % SF	180.2	0.086	
	Sac 30 % F	200.4	0.124	13.8
Tefose 1500	SLNs suspendidas	232.2	0.200	
	Sac 20 % SF	277.9	0.238	
	Sac 20 % F	241.2	0.122	38.5
Tefose 63	SLNs suspendidas	237.1	0.092	
	Sac 20 % SF	280.8	0.177	
	Sac 20 % F	256.3	0.238	44.5
Myrj S100	SLNs suspendidas	230.6	0.117	
	Sac 20 % SF	278.5	0.251	
	Sac 20 % F	277	0.159	32.7

^a Nanopartículas suspendidas sin liofilizar (S), liofilizadas sin filtrar (SF) y liofilizadas filtradas (F)

^b Distribución del tamaño de partícula (PSD), índice de polidispersidad (Pdl), potencial zeta (ZP) de las formulaciones fabricadas.

Tabla S5. Comparación de las características fisicoquímicas entre nanopartículas con el PEG Tefose 63 suspendidas en medio acuoso, liofilizadas sin filtrar y liofilizadas filtradas sometidas a diferentes rampas de temperatura.

Rampa (T°) ^a	SLNs	PSD ^b (nm)	Pdl	ZP (mV)
Rampa #1	SLNs suspendidas	158.5	0.200	46.2
	Sin filtrar	185.6	0.260	
	Filtrado	181.1	0.250	28.6
Rampa #2	SLNs suspendidas	184	0.200	
	Sin filtrar	203.1	0.220	
	Filtrado	201.4	0.230	30.7
Rampa #3	SLNs suspendidas	195.1	0.180	
	Sin filtrar	193	0.220	
	Filtrado	204.1	0.230	25.5
Rampa #4	SLNs suspendidas	202.4	0.210	
	Sin filtrar	215.4	0.210	
	Filtrado	200.9	0.130	26.2
Rampa #5	SLNs suspendidas	209.7	0.190	
	Sin filtrar	233.7	0.260	
	Filtrado	244.9	0.240	22.9
Rampa #6	SLNs suspendidas	217.7	0.160	37.6
	Sin filtrar	237.3	0.240	
	Filtrado	232.8	0.220	30.6

^a Rampas de temperatura empleadas en la optimización del proceso de liofilización.

^b Distribución del tamaño de partícula (PSD), índice de polidispersidad (Pdl) y potencial zeta (ZP).

Tabla S6. Correlaciones y regresiones entre las características fisicoquímicas (Pdl, PSD y ZP) de los cSLN suspendidos y el tiempo transcurrido (30 días) de cada formulación de PEG a dos temperaturas (4 °C y 25 °C) expuestas.

PEG (150 mg)	Pdl				PSD (nm)				ZP (mV)			
	4 °C		25 °C		4 °C		25 °C		4 °C		25 °C	
Brij S100	$P = 0.007$	$R^2 = 0.731$	$P < 0.001$	$R^2 = 0.888$	$P = 0.013$	$R^2 = 0.671$	$P = 0.008$	$R^2 = 0.719$	$P = 0.266$	$R^2 = 0.200$	$P = 0.520$	$R^2 = 0.072$
Gelucire	$P = 0.509$	$R^2 = 0.074$	$P = 0.001$	$R^2 = 0.864$	$P = 0.023$	$R^2 = 0.604$	$P = 0.071$	$R^2 = 0.450$	$P = 0.030$	$R^2 = 0.572$	$P = 0.160$	$R^2 = 0.300$
Myrj 52	$P = 0.688$	$R^2 = 0.029$	$P = 0.005$	$R^2 = 0.755$	$P = 0.032$	$R^2 = 0.561$	$P = 0.034$	$R^2 = 0.556$	$P = 0.007$	$R^2 = 0.728$	$P = 0.067$	$R^2 = 0.453$
Myrj S100	$P = 0.653$	$R^2 = 0.036$	$P = 0.022$	$R^2 = 0.609$	$P = 0.040$	$R^2 = 0.533$	$P = 0.001$	$R^2 = 0.844$	$P < 0.001$	$R^2 = 0.952$	$P = 0.134$	$R^2 = 0.334$

Tabla S7. Correlaciones y regresiones entre las características fisicoquímicas (Pdl, PSD y ZP) de los cSLN liofilizadas y el tiempo transcurrido (1 un año) de cada formulación de PEG a dos temperaturas (4 °C y 25 °C) expuestas.

PEG (150 mg)	Pdl				PSD (nm)				ZP (mV)			
	4 °C		25 °C		4 °C		25 °C		4 °C		25 °C	
Brij S100	$P = 0.652$	$R^2 = 0.056$	$P = 0.104$	$R^2 = 0.523$	$P = 0.024$	$R^2 = 0.758$	$P = 0.088$	$R^2 = 0.559$	$P = 0.039$	$R^2 = 0.695$	$P = 0.023$	$R^2 = 0.763$
DSPE	$P = 0.607$	$R^2 = 0.072$	$P = 0.752$	$R^2 = 0.028$	$P = 0.118$	$R^2 = 0.496$	$P = 0.303$	$R^2 = 0.258$	$P = 0.469$	$R^2 = 0.138$	$P = 0.774$	$R^2 = 0.023$
Gelucire	$P = 0.040$	$R^2 = 0.691$	$P = 0.323$	$R^2 = 0.241$	$P = 0.080$	$R^2 = 0.576$	$P = 0.867$	$R^2 = 0.008$	$P = 0.655$	$R^2 = 0.055$	$P = 0.238$	$R^2 = 0.325$
Myrj 52	$P = 0.013$	$R^2 = 0.819$	$P = 0.139$	$R^2 = 0.460$	$P = 0.916$	$R^2 = 0.003$	$P = 0.286$	$R^2 = 0.275$	$P = 0.628$	$R^2 = 0.064$	$P = 0.694$	$R^2 = 0.043$
Myrj S100	$P = 0.450$	$R^2 = 0.149$	$P = 0.173$	$R^2 = 0.406$	$P = 0.065$	$R^2 = 0.615$	$P = 0.159$	$R^2 = 0.428$	$P = 0.005$	$R^2 = 0.374$	$P = 0.922$	$R^2 = 0.003$

ANEXO IV

Rampas de temperatura

- **Convencional**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying → -15 °C, 20 h; 0,3 mbar
 - Secondary drying → 25 °C, 20 h
- **Rampa # 1**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying → 0,3 mbar
 - -35 °C, 2 h
 - -30 °C, 2 h
 - -25 °C, 2 h
 - -20 °C, 2h
 - -15 °C, 12 h
 - Secondary drying → 25 °C, 12 h
- **Rampa # 2**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying → 0,3 mbar
 - -45 °C, 2 h
 - -40 °C, 2 h
 - -35 °C, 2 h
 - -30 °C, 12h
 - -15 °C, 8 h
 - Secondary drying → 25 °C, 16 h
- **Rampa # 3**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying → 0,3 mbar
 - -50 °C, 2 h
 - -45 °C, 2 h
 - -40 °C, 2 h
 - -35 °C, 12h
 - -20 °C, 8 h
 - Secondary drying → 25 °C, 16 h

Ensayos de vacío

- **Rampa # 1**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying
 - 0.1 mbar
 - 0.2 mbar
 - 0.25 mbar
 - 0.3 mbar
 - 0.325 mbar
 - 0.35 mbar
 - 0.375 mbar
 - 0.4 mbar
 - Secondary drying → 25 °C, 16 h
- **Rampa # 1**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying → 0,3; 0,325; 0,35; 0,375 mbar
 - -55 °C, 2 h
 - -45 °C, 3 h
 - -38 °C, 12 h
 - -20 °C, 8 h
 - Secondary drying → 25 °C, 18 h

Optimización del proceso de liofilización

- **Rampa # 1**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying → 0,3 mbar
 - -55 °C, 2 h
 - -45 °C, 3 h
 - -38 °C, 12 h
 - -20 °C, 8 h
 - Secondary drying
 - 5 °C, 5 h
 - 25 °C, 16 h
- **Rampa # 2**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying → 0,3 mbar
 - -55 °C, 2 h
 - -45 °C, 3 h
 - -38 °C, 12 h
 - -20 °C, 4 h
 - -5 °C, 4 h
 - Secondary drying
 - 5 °C, 5 h
 - 25 °C, 16 h
- **Rampa # 3**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying → 0,3 mbar
 - -55 °C, 2 h
 - -45 °C, 4 h
 - -38 °C, 12 h
 - -20 °C, 4 h
 - -5 °C, 4 h
 - Secondary drying
 - 5 °C, 4 h
 - 15 °C, 4 h
 - 25 °C, 12 h
- **Rampa # 4**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying → 0,3 mbar
 - -55 °C, 2 h
 - -45 °C, 4 h
 - -38 °C, 12 h
 - -20 °C, 4 h
 - -5 °C, 4 h
 - 5 °C, 4 h
 - 15 °C, 4 h
 - Secondary drying
 - 25 °C, 12 h
- **Rampa # 5**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying → 0,3 mbar
 - -55 °C, 2 h
 - -45 °C, 4 h
 - -38 °C, 12 h
 - -20 °C, 4 h
 - 5 °C, 4h
 - 15 °C, 4 h
 - Secondary drying
 - 25 °C, 12 h
- **Rampa # 6**
 - Freezing → -55 °C, 2 h
 - Primary drying → 0,3 mbar
 - -55 °C, 2 h
 - -45 °C, 4 h
 - -38 °C, 12 h
 - -20 °C, 8 h
 - -5 °C, 4h
 - Secondary drying
 - 5°C, 4h
 - 15 °C, 4 h
 - 25 °C, 12 h

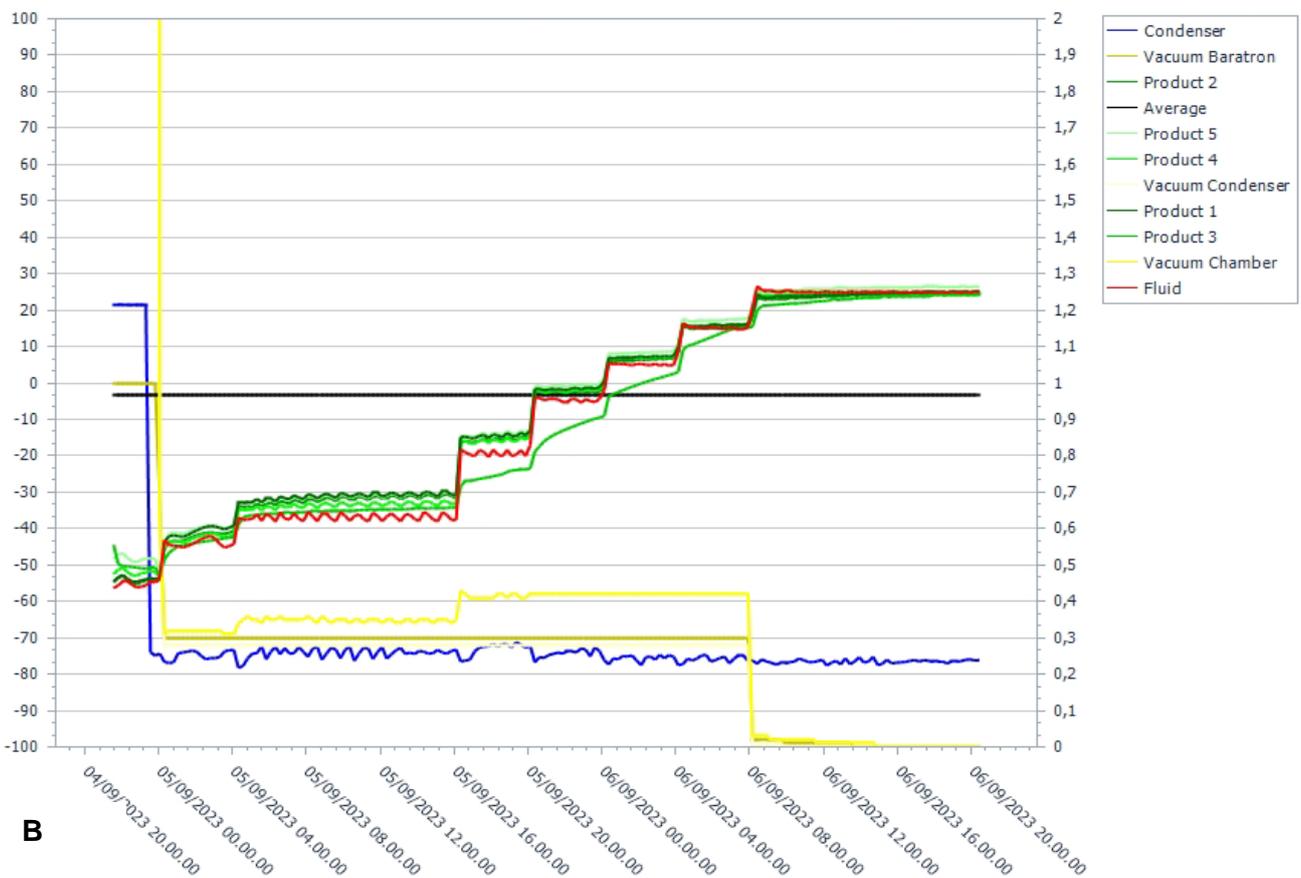
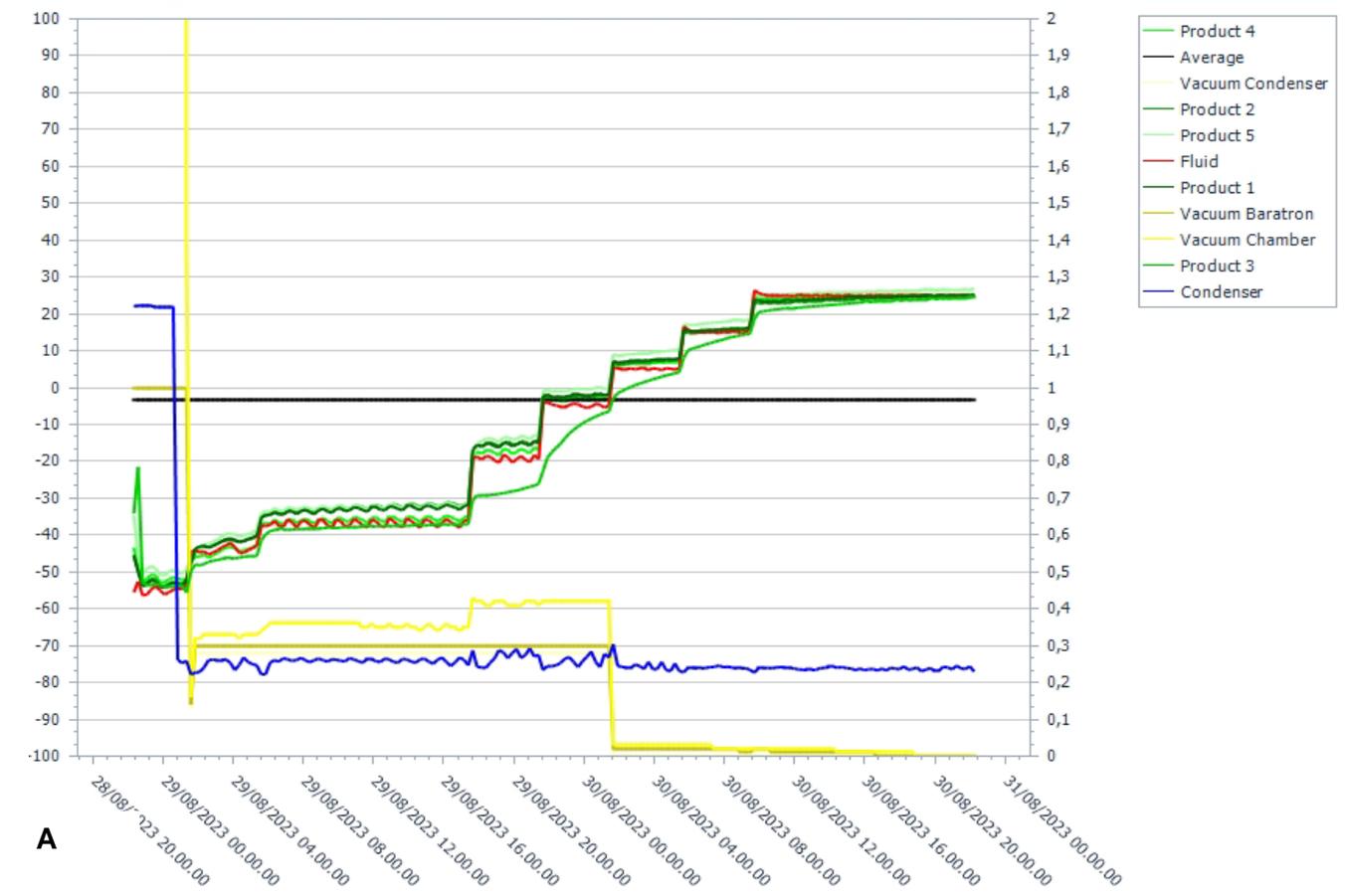
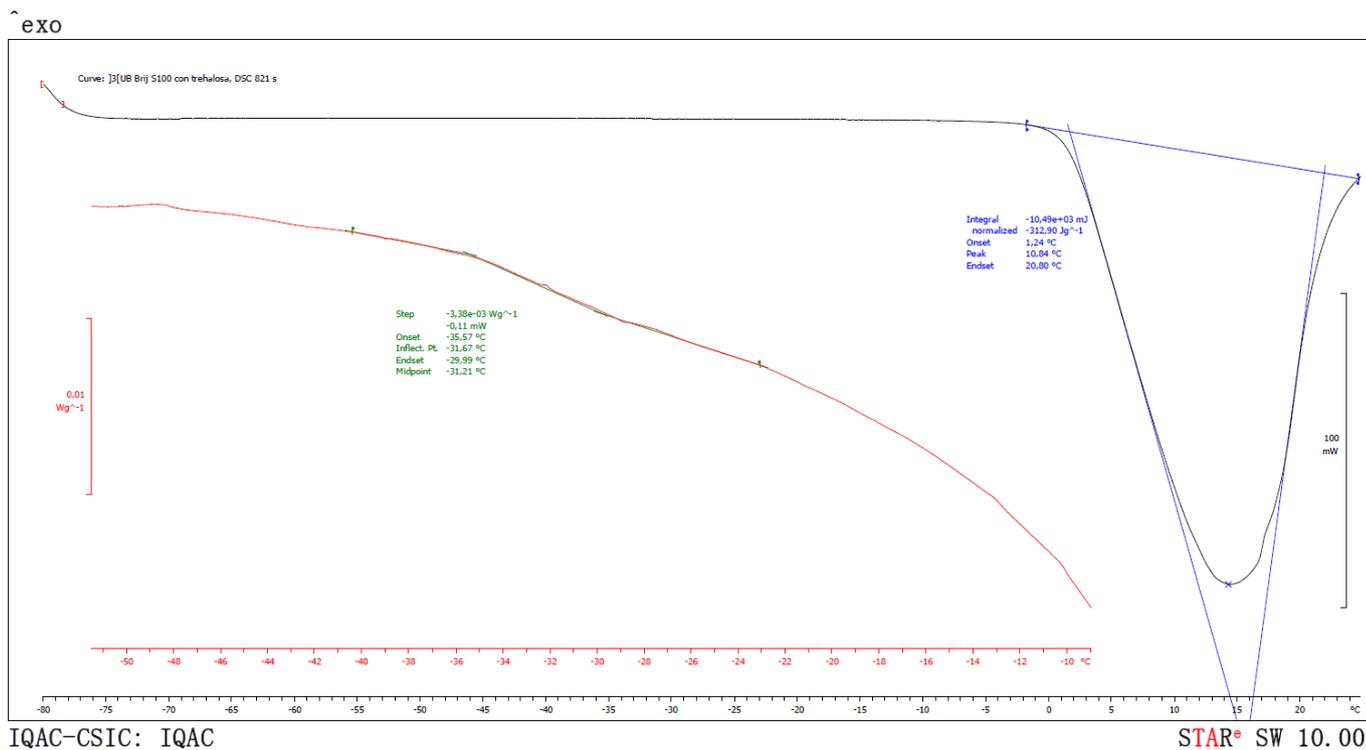
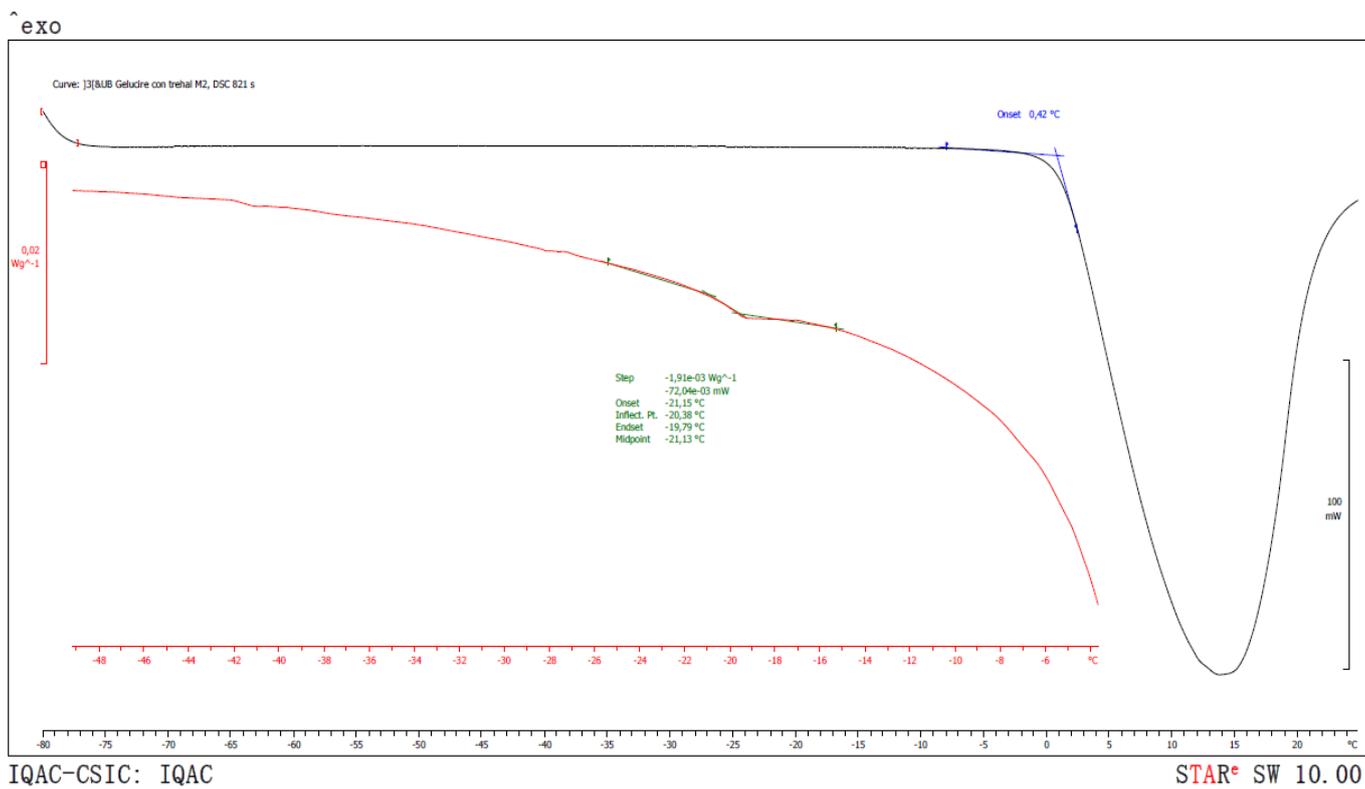


Figura S1: Gráficos de las rampas #3 (A) y #4 (B) empleadas en la optimización del proceso de liofilización con la formulación de PEG Tefose 63.

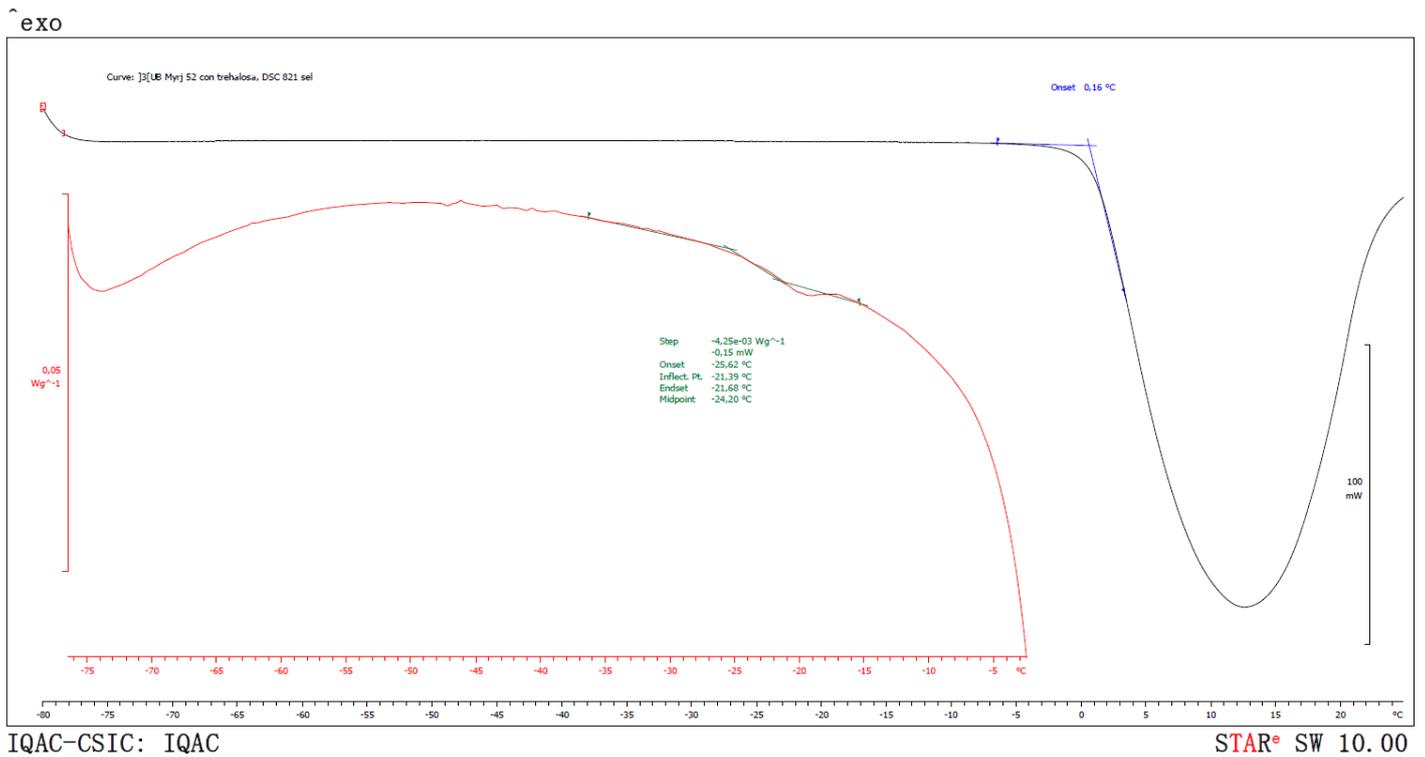
ANEXO V



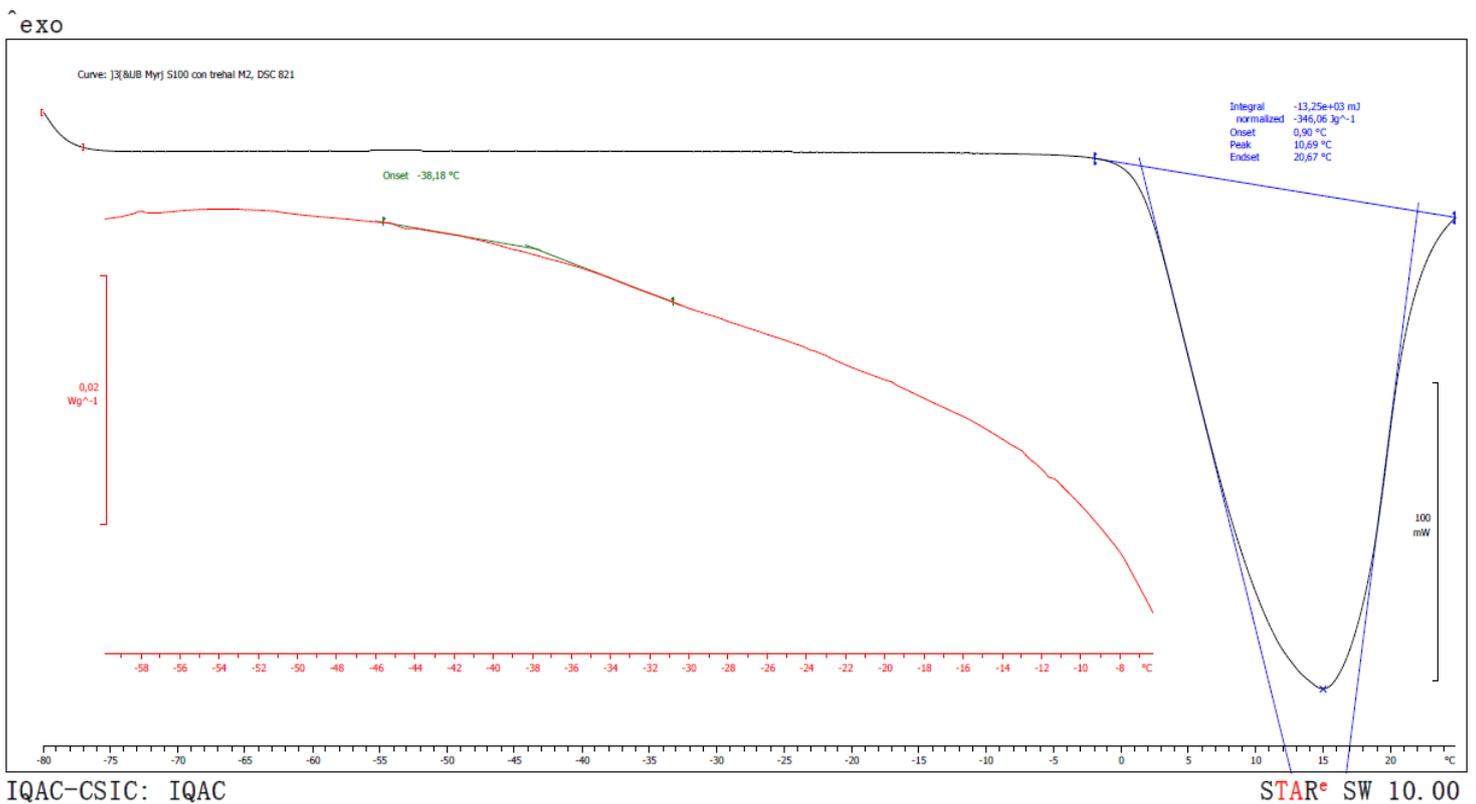
A



B

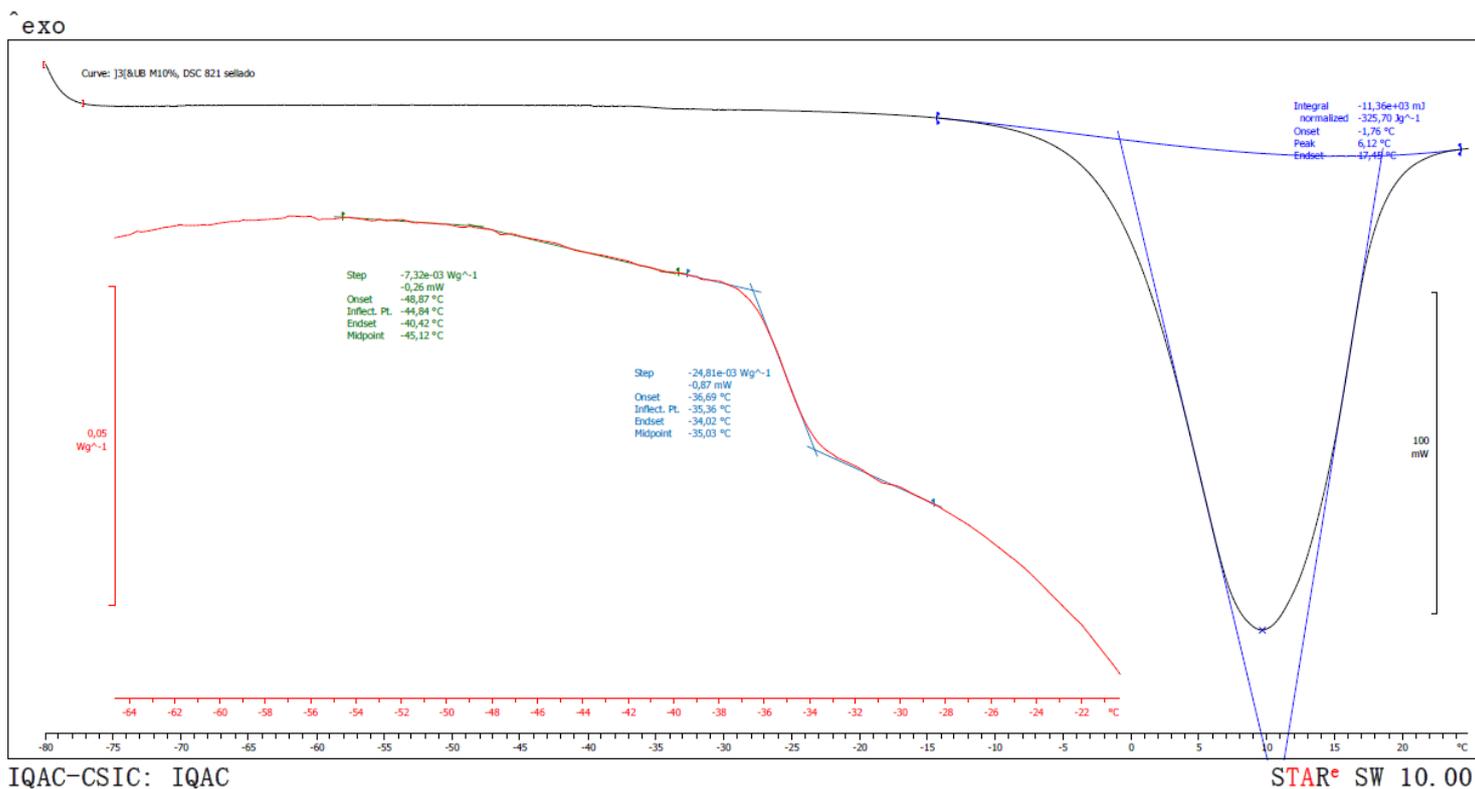


C

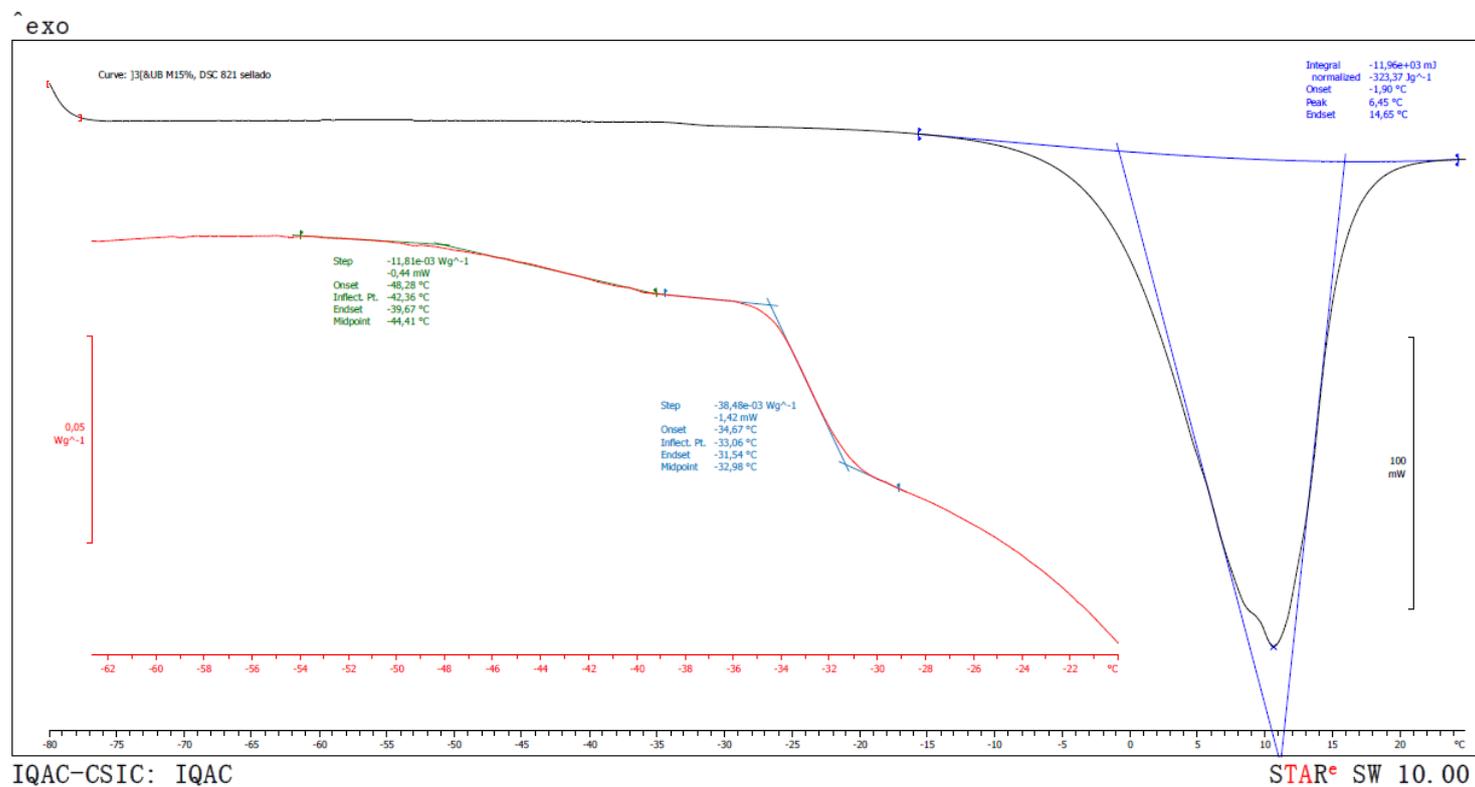


D

Figura S2: Análisis DSC de cuatro PEG-cSLN suspendidos en una solución de trehalosa al 5%. Brij S100 (A), Gelucire (B), Myrj 52 (C), and Myrj S100 (D). los. Brij S100 (A), Gelucire (B), Myrj 52 (C) y Myrj S100 (D).



A



B

Figura S3: Análisis DSC de la formulación con el PEG Myrj 52 y cistamina suspendidos en una solución de trehalosa al 10% (A) y 15% (B).