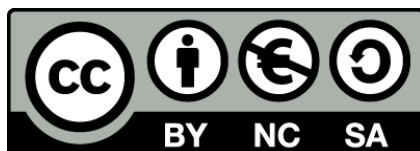




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Desarrollo de Nanopartículas Lipídicas para vehicular siRNA a través de la Barrera Hematoencefálica

Ronny Vargas Monge



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

Desarrollo de Nanopartículas Lipídicas para vehicular siRNA a través de la Barrera Hematoencefálica

Ronny Vargas Monge

2024

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y CONTROL DE
MEDICAMENTOS

**Desarrollo de Nanopartículas Lipídicas para vehiculizar siRNA
a través de la Barrera Hematoencefálica**

Memoria presentada por Ronny Vargas Monge 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:

Ronny Vargas Monge

Tutor:

Dr. Josep María Suñé Negre

RONNY VARGAS MONGE,

Barcelona, 2024

Todo lo que yo invento, todo lo que yo imagino,
quedará siempre más allá de la verdad,
porque llegará un momento en que las creaciones de la ciencia
superarán a las de la imaginación

Julio Verne

A CATA, Juli, Pau y Lucy.

Para ellos, todo.

Agradecimientos

De todas las palabras de este documento, tengo la certeza de que las de esta sección serán las que más personas van a leer. Espero estar a la altura del compromiso que representa escribirlas, y de los sentimientos que mueven lo que cada persona mencionada aquí representa.

A mi familia. A mis papás, mis hermanos y mis sobrinos. Este trabajo, y el período de la vida que este trabajo representa, es un sacrificio colectivo. Quizá no fui consiente de eso durante mucho tiempo, pero ahora lo soy. Gracias por el amor y el apoyo a la distancia. Sin duda ahora tendremos tiempo para reponer.

A todas las personas que formaron parte de mi entorno laboral hasta el día que inicié este proceso. Gracias a mis compañeros tanto en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica, como en CALOX de Costa Rica. La forma en que abordé este doctorado y los retos que se presentaron no hubieran sido la misma sin las experiencias y la madurez profesional lograda al lado de cada una las personas que cruzaron ese camino conmigo. Este agradecimiento es extensivo a mis compañeros y profesores en los estudios previos, que al fin y al cabo son un eslabón más en el proceso que culmina (¿?) aquí.

A la Universidad de Costa Rica por el respaldo brindado para mi formación académica en el exterior, y todo el apoyo brindado a mí y mi familia a lo largo de los últimos años.

También a las personas que me antecedieron en el grupo de investigación y que contribuyeron al desarrollo de esta línea de trabajo durante más de una década. En particular, quiero agradecer a Carolina Carrillo y David Narvaéz. A Caro, quien no solo participó en los inicios de esta línea, sino con quien tuve el placer de compartir la esencia del “PURA VIDA”, y ver la amistad crecer entre nuestras familias. Y a David, de quien recibí el relevo en el laboratorio. Gracias, David, por recibirme con los brazos abiertos, por enseñarme los procedimientos y por hacer que me sintiera a gusto en el “lab”.

A los compañeros con quienes compartí pasillo en la facultad, y que me acompañaron el día a día: todo el personal del SDM, del departamento y de los programas de Másters y Posgrados. Gracias por hacerme sentir parte, por hacerme sentir en casa. Gracias por tender una mano siempre que lo necesité.

Quiero agradecer especialmente a la dualidad constituida indistintamente por Inma y Ester, gracias por el apoyo con gestiones de congresos, con preguntas sobre reglamentos o trámites, o hasta por unas hojas de papel o un lápiz. Gracias por ayudarme a pesar de que “no soy tan bueno como Alex”. A Yeray, por siempre ayudarme a salir del apuro, ya fuera con una comanda o material de laboratorio, y por avisarme cuando ya era hora del café. Aitor, gracias por las ayudas con los pedidos de la farmacia. ¡Mucho ánimo, que eres el siguiente! A Dolors, que siempre hizo llegar los materiales necesarios y envió mis muestras a Granada, muchas gracias. También quiero agradecer a Anna Nardi, por recibirme cuando hice mi TFM y por tu disposición constante a ofrecer una mano. Gracias por visitarnos en el hospital, ¡y por los melindros! Gracias Encarna por el apoyo y la confianza que siempre me transmitiste, y por acompañarme a comer en los primeros días recién llegado a Barcelona. Gracias Pili, por la ayuda con toda la parte del desarrollo analítico del método HPLC. Mucho me gustaría tener tu habilidad para hacer

comentarios siempre de forma tan constructiva. A Alex, gracias por que cuando necesité de tu apoyo, estuviste involucrado como si se tratara de tu propia tesis. Te debo una birra, otra. A Débora, gracias por tu empatía en momentos difíciles para mí y mi familia. Gracias por los *spoilers* con uno de los temas más comunes en la mesa de la comida, las series y pelis. Y a todos, gracias a todos por los días de *Tupper free*.

De manera muy especial, quiero agradecer a Roser, Clara, Emma, Julia y Joan. Gracias por escucharme y acompañarme en momentos muy complicados. Gracias por distraerme cuando lo necesitaba, por enseñarme palabras nuevas de catalán y por darme siempre las mejores recomendaciones de paseos y experiencias que me ayudaron a disfrutar muchísimo más de mi tiempo viviendo en Cataluña. Vuestra amistad fue un verdadero salvavidas. Gracias por escucharme. Lo digo dos veces, porque me habéis escuchado mucho.

A mis compis de piso en Granada. A Blanca, a Esteban y a María (sí, María tú también). Una parte muy importante de este viaje no hubiera sido posible sin vuestra hospitalidad. E indudablemente no hubiera sido lo mismo sin nuestro domingo de películas de “El Chino” Darín. Gracias por recibirme, y llevarme de tapas. A las demás personas del lab 109 y del López. Particularmente a Sandra y a Cristina (gracias a Cristina por una semana muy intensa de formación). Además del apoyo científico, gracias a todos por haberme hecho sentir uno más cuando tuve la maravillosa oportunidad de visitarles.

A Noelia. Cualquier cosa que escriba aquí se queda corta para expresar la gratitud no solo al apoyo que me diste, sino a la excelente actitud y entusiasmo con los que siempre lo hiciste. Esta tesis no sería lo que es, ni por asomo, sin tu aporte. Espero poder devolverte, aunque sea en parte, lo que hiciste por este trabajo. Gracias por llamarle nanos a las nanos.

A Kevin, Laura y Elena, por haber puesto su esfuerzo y sus manos a disposición de experimentos importantes de este trabajo. Kevin, gracias por tu paciencia. Me tuviste tú a mí, más paciencia de la que yo me merecía. Laura y Elena, gracias por ser el apoyo justo en los momentos en que más lo necesité. Espero poder apoyarles en el camino que inician con sus propios doctorados.

Al grupo de papás del Pere Vila. A las clases de los Caballos, los Peces, los Koalas, Arc Triomf y los *Rel·lotges*. Muy especialmente a Alejandro, Andrea, Selena, Marzio, Caro y Dani. Gracias por darle siempre tanto cariño a Juli. Gracias por ayudarnos a cuidarlo cuando yo no podía, y cuando en casa, había uno menos. Así, al cuidar de él, me habéis cuidado a mí también.

Al grupo de amigos “Lizano Lovers”, por ser *aquí*, un pedacito de *allá*. Por ser tribu. Gracias Daniela por abrirnos a todos las puertas de tu casa, y por ayudar a darle forma a este grupo. Gracias Zita y Obryan, por invitarnos varias últimas veces a Salou, por querer tanto a Juli y por la compañía en la cirugía. A Roel, Dania y Joha por las empanaditas y antojitos, por salvarnos la tanda con la refri y por acompañarme durante el aislamiento en el hospital. A Adri y Flo (y a Ainara) por tantas cositas para Paula, nos llenaron de bendiciones y a nuestra bebé no le hizo falta nada, gracias a ustedes.

A mis compañeros de tesis a la distancia. Erick, Luis, José Alexis. Gracias por las conversaciones que sirvieron siempre para orientarme y darme ánimo. Gracias por compartir sus avances, y preguntar por los míos, haciendo de este proceso uno compartido a pesar de la distancia.

Gracias por ser una inspiración y ejemplo. Gracias a su apoyo, este trabajo también salió a delante. Espero que sigan cosechando logros académicos, no me cabe duda de que así será. Ojalá sigamos compartiendo el camino sin importar la distancia.

A mis amigos, Juan Carlos, Loaiciga, Arturo, Pedro, Cata, Carla y Nelson. Los tuve siempre conmigo en este camino. Gracias por estar *aquí*, aunque estén *allá*. Gracias por atravesar fronteras y ayudarme a mantenerme conectado con tantas cosas buenas que hemos vivido a lo largo de los años y por seguir compartiendo nuestras vivencias, mientras cada uno de nosotros sigue transformándose en el camino. Gracias por ser un ancla. Ustedes han sido fundamentales para mi bienestar mental, y eso lo vale todo. Gracias amigos, ¡los quiero mucho!

Gracias, JuanCa, por el chat más multi-tema que tengo en el teléfono, por el intercambio de ideas y el constante debate. Gracias también por aguantar mi intensidad. Loaiciga, gracias por compartir detalles innecesarios, curiosidades científicas (y no tanto) o culturales, y por supuesto, por las cortas y esporádicas sesiones de juegos. ¡Qué clase de breteada nos pegamos juntos! ¡JPdCP! Arturo, ¿y entonces? Gracias por el regalo de su visita para mis 40, y por recibirme en Berlín. Por la Euro, por la adicción a la salsa de maní o al “*oh my truffle*”. Gracias por las transacciones financieras que hicieron tambalear el mercado internacional y, sobre todo, por la confianza que siempre ha tenido en mí. A DON Pedro porque, aunque pueden pasar meses sin hablar, en el momento en que nos ponemos al día es como si no hubiera pasado ni un día de la última vez. ¡Que sea pronto la próxima!

A Cata, por las conversaciones en tres plataformas distintas, por venir a visitarnos, por los chismes y las risas escandalosas, y por estar siempre ahí para apoyar. Carlita, gracias por estar siempre pendiente de cualquier cosa que le cuente, por acompañarme a correr la media de Donosti y recorrer el norte juntos. Pero, sobre todo, gracias por tu disposición para escuchar y por querer darle calidez a esos momentos complicados.

Nelson. Mi amigo, compañero, casi hermano. Acá estuviste también conmigo en cada tontera. Ahora que seguí, y no jalé, no veo el momento de darte un abrazo grande, y volver a quedar juntos para ver si puedo llegar con una bolsa de hielo pingüino.

A mis directores y tutor, por la confianza generosa que depositaron en mí. Gracias por hacerme sentir bienvenido desde el primer día y darme un lugar en este equipo, un lugar al que espero hacer justicia. Gracias por acogerme y por dar forma, juntos, a este proyecto.

A Josep Maria Suñé. Per haver-me acceptat al grup. Vas respondre aviat i amablement a la meva consulta, i efectivament em vas donar el lloc que m’havies promès. Tota aquesta experiència no hauria estat possible sense tu. Gràcies pels dinars a Trade i per la teva calidesa. Et trobaré molt a faltar.

A Marc, por haber sido el director que necesitaba. Gracias por el espacio para trabajar a mi manera y la atención que me diste cuando la necesité. Por asumir el reto de dirigirme, que no ha de haber sido nada fácil. Agradezco todo el aprendizaje: por ayudarme a conocerme un poco más, por enseñarme a ser más cauteloso con mis puntos de vista. Gracias por hacerme dudar cuando estaba demasiado seguro y por darme seguridad cuando estaba dudando. Espero que lo que dejo en esta experiencia de aprendizaje mutuo sea, al menos, una pequeña parte de lo que yo me llevo.

A Carles, por ser a la vez un ejemplo de investigador y un modelo de sencillez. Por tu entusiasmo científico, siempre dispuesto a tomar nuevas ideas y a realizar nuevos experimentos. Gracias por ser un referente como director y como profesor. Por la retroalimentación siempre tan respetuosa y empoderadora. Sobre todo, quisiera llevarme ese estilo tuyo; de ser así, es posible que en el futuro los estudiantes que yo tenga también deban dedicarte algún agradecimiento a ti. Eso espero.

Al personal médico de Instituto Oncológico Avanzado, y todas sus atenciones. Cada día que estuve con ustedes fue un día sanando. Gracias por su calidez y sus cuidados.

Gracias a grupo de células cancerígenas que decidieron poner interesante estos últimos meses. Algunos de los caminos que transitamos juntos me ayudaron también a conocerme mejor y a querer tomar control de algunos aspectos de mi vida. Gracias por ayudarme a encontrar al monstruo de la ansiedad, y darme las herramientas para domarlo. Gracias también por enseñarme a relativizar. Y gracias por haberse ido, también lo digo.

Doña Lorena, la mejor suegra que alguien pueda tener. Gracias por cuidar a su hija, a sus nietos, y por cuidarme a mí. No me queda vida para agradecer la bendición que fue tenerla aquí cada vez que vino, pero, sobre todo, en esos meses tan intensos del final.

Por último, y dejando lo mejor y más importante para el final...

A Lucy, nuestra bebé en el cielo. Fue un tiempo demasiado corto, pero también fuiste parte de esta aventura. Gracias por enseñarnos a todos en esta familia a amar sin apego, y por recordarnos que, mientras acá nos queramos, podemos enfrentar lo que se nos ponga en frente. También me preparaste para lo que venía. Gracias *Lucy in the sky*.

A Paula, mi chini, mi mariposita arcoíris. Gracias por venir. Gracias por acompañarme cada día de redacción de esta tesis. Yo estaba sentado escribiendo, y cuando sentía una mirada, volteaba y ahí veía tus ojos. Esos ojos dulces y esa sonrisa radiante eran la mejor motivación para terminar rápido. No veía la hora de terminar esta tesis y empezar a chinearte el día entero. De chinearte la vida entera.

A Julián, mi verdadero maestro. Gracias por la maravillosa aventura de la tesis más desafiante y hermosa de todas: ser tu papá. La tarea de redescubrir el mundo a través de tus ojos es muchísimo más emocionante que cualquier otra investigación. Espero que de esta experiencia te queden el esfuerzo y el cariño con los que tus papás hicieron sus trabajos. Gracias también por prestarle a esta tesis parte del tiempo que era para jugar contigo. ¡Ya la terminamos!

A CATA, la mejor colega, co-worker, compañera de vida, co-materna y compañera de tesis. Gracias por ser la arquitecta de esta aventura, aventura en la que cambiamos, aprendimos, y nos llevamos mucho de vuelta, mucho más de lo que nos hubiéramos imaginado (también dejamos algunas cosas). Gracias por el crecimiento mutuo de cada día. Podría escribirse otra tesis intentando abordar todo lo que representa en mi vida y la fuerza constructora que es el amor que nos tenemos ... quizás 16 tesis más. Por cierto, gracias por su tesis ejemplar. Gracias por el amor. No puedo esperar para vivir las próximas aventuras que emprendaremos juntos. Te amo.

Resumen

La administración de medicamentos hacia el sistema nervioso central (SNC) es uno de los principales retos en la neurofarmacología, principalmente debido a la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE). Aunque esta barrera es crucial para mantener la homeostasis al excluir toxinas y patógenos, también limita drásticamente el paso de más del 98% de los fármacos convencionales y prácticamente todos los biofármacos, incluyendo los ácidos nucleicos.

En este contexto, el uso de nanopartículas, y en particular de nanopartículas lipídicas, ha ganado relevancia como una estrategia para mejorar la entrega de terapias al cerebro. Las nanopartículas lipídicas presentan propiedades físico químicas que les permiten enfrentar el reto que significa la barrera hematoencefálica, particularmente su pequeño tamaño y su capacidad de modificación superficial con ligandos específicos para el direccionamiento activo. Adicionalmente, en la última década, han emergido como el tipo de vehículo más apto, y con éxito en la aplicación clínica, para el direccionamiento de terapias con ácidos nucleicos.

En esta investigación, se desarrolló una formulación base de nanopartículas lipídicas ionizables (LNPs) destinada a la vehiculización de siRNA a través de la BHE. Las nanopartículas se preparan mediante la mezcla microfluídica de soluciones lipídicas en etanol, y soluciones acuosas de siRNA. El proceso de desarrollo se guió por los principios de Calidad por Diseño (QbD), permitiendo un entendimiento profundo de los parámetros críticos de proceso (CPP) y de formulación que afectan los atributos críticos de calidad (CQA) de las nanopartículas. Esto facilitó la optimización del tamaño de partícula, el potencial zeta, el índice de polidispersidad y la eficiencia de encapsulación, garantizando que la formulación fuera reproducible y estable para aplicaciones futuras.

Durante las exploraciones experimentales de esta investigación, surgieron hallazgos que desafían algunas de las nociones establecidas en el estado del arte de la fabricación de nanopartículas lipídicas, particularmente en lo que respecta a los parámetros críticos de proceso (CPP) y de formulación. Por ejemplo, se descubrió que la diálisis, generalmente considerada un paso secundario, impacta de manera significativa el tamaño de partícula, el potencial zeta y el PDI, además de modificar la influencia de la proporción de flujo (FRR), un parámetro clave en la fabricación. Asimismo, se determinó que solo una fracción de la maleimida añadida está disponible en la superficie de las nanopartículas para la funcionalización, lo que resalta la importancia de cuantificarla como un atributo crítico de calidad (CQA) en lugar de asumir que toda la cantidad agregada es funcional.

Una vez establecida la formulación base, se avanzó hacia la funcionalización de las nanopartículas para potenciar su capacidad de atravesar la BHE. Se emplearon diferentes péptidos, seleccionados a partir de una revisión sistemática exhaustiva, como Angiopep-2, RVG, MiniAp-4 y THRre, los cuales se acoplaron a las nanopartículas mediante reacción con la maleimida. El tiempo de incubación, pH y proporción maleimida a péptido fueron optimizados para asegurar una alta eficiencia de funcionalización.

Finalmente, las nanopartículas demostraron ser biocompatibles y eficaces en la internalización celular y el silenciamiento génico en modelos celulares in vitro, lo que evidenció su capacidad para transportar y liberar siRNA dentro del citoplasma. Adicionalmente, estudios preliminares de biodistribución in vivo mostraron que las nanopartículas, incluso sin funcionalizar, lograron acumularse en el cerebro. Estos resultados confirman su potencial para aplicaciones terapéuticas en el SNC, abriendo las puertas a futuros avances en el tratamiento de enfermedades neurológicas, trastornos psiquiátricos y tumores cerebrales.

Abstract

The delivery of therapeutic agents into the central nervous system (SNC) remains one of the main challenges in neuropharmacology, primarily due to the presence of the blood-brain barrier (BBB). While this barrier is crucial for maintaining homeostasis by excluding toxins and pathogens, it also drastically limits the passage of over 98% of conventional drugs and almost all biopharmaceuticals, including nucleic acids.

In this context, the use of nanoparticles, particularly lipid nanoparticles, has gained prominence as a strategy to enhance brain-targeted therapy delivery. Lipid nanoparticles possess physicochemical properties that enable them to overcome the challenges arising from the BBB, such as small size and the capacity for surface modification with targeting ligands. Additionally, over the past decade, lipid nanoparticles have emerged as the most suitable vehicle for delivering nucleic acid-based therapies, with notable clinical success.

This study developed a base formulation of ionizable lipid nanoparticles (LNPs) designed for siRNA delivery across the BBB. The nanoparticles were prepared using microfluidic mixing of lipid solutions in ethanol with aqueous siRNA solutions. The development process was guided by Quality by Design (QbD) principles, allowing for a deep understanding of the critical process parameters (CPP) and formulation attributes that influence the critical quality attributes (CQA) of the nanoparticles. This facilitated the optimization of particle size, zeta potential, polydispersity index (PDI), and encapsulation efficiency, ensuring a reproducible and stable formulation for future applications.

During experimental investigations, several findings emerged that challenge established notions in LNPs fabrication, particularly concerning critical process and formulation parameters. For instance, dialysis, often considered a secondary step, was found to significantly affect particle size, zeta potential, and PDI, while also altering the influence of the flow rate ratio (FRR), a key parameter in nanoparticle fabrication. Additionally, it was found that only a fraction of the maleimide added to the formulation is available on the nanoparticle surface for functionalization, underscoring the importance of quantifying maleimide as a CQA rather than assuming full functionality of the added amount.

After establishing the base formulation, functionalization of the nanoparticles was performed to enhance their ability to cross the BBB. Various peptides, selected from a comprehensive systematic review, including Angiopep-2, RVG, MiniAp-4, and THRre, were conjugated to the nanoparticles via maleimide-based chemistry. The incubation time, pH, and maleimide-to-peptide ratio were optimized to ensure high functionalization efficiency.

Finally, the nanoparticles demonstrated biocompatibility and efficacy in cellular internalization and gene silencing experiment in *in vitro* cell models, confirming their ability to transport and release siRNA into the cytoplasm. Preliminary *in vivo* biodistribution studies further indicated that the nanoparticles, even the non-functionalized, were able to accumulate in the brain. These results confirm the potential of LNPs for therapeutic applications in the SNC, opening the gates to future advancements in treating a broad spectrum of neurological and psychiatric disorders and brain tumours.

Correspondencia con Objetivos de Desarrollo Sostenible

Esta tesis doctoral contribuye al logro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible y aborda la perspectiva de género de la siguiente manera:

En primer lugar, la investigación está alineada con el Objetivo número 3 (Salud y Bienestar), que busca garantizar una vida sana y promover el bienestar para todas las personas, sin importar su edad. El desarrollo de sistemas avanzados de liberación de fármacos que permitan un direccionamiento al sistema nervioso central, para lograr así el tratamiento enfermedades que actualmente son de difícil abordaje por la presencia de la barrera hematoencefálica. Adicionalmente, las investigaciones orientadas a mejorar la eficiencia de los procesos de desarrollo y fabricación de medicamentos promueven reducir el costo de las terapias y mejorar así la accesibilidad de la salud.

En segundo lugar, esta tesis se vincula también con el cumplimiento del objetivo número 4 (Educación de Calidad), ya que su desarrollo y divulgación a través de publicaciones científicas y foros académicos contribuye a la generación y transmisión de conocimiento de alto nivel en el ámbito científico. Además, esta investigación promueve el establecimiento de lazos de cooperación académica entre las facultades de Farmacia de la Universidad de Barcelona y la Universidad de Costa Rica; formando además parte del plan de desarrollo docente y especialización de la última.

Además, el trabajo se relaciona con el objetivo número 9 (Industria, Innovación e Infraestructura), ya que a través de la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías que contribuye al avance del conocimiento e infraestructura científica y tecnológica.

Perspectiva de Género

Muchas de las enfermedades del sistema nervioso central presentan una mayor prevalencia en mujeres. Por ello, el desarrollo de estrategias más efectivas para el direccionamiento de nuevos tratamientos neurológicos ofrece una oportunidad para disminuir las disparidades de género que estos trastornos pueden causar, y promover un enfoque más equitativo en el abordaje de estas patologías.

ÍNDICE

Resumen	v
Abstract	vii
Correspondencia con Objetivos de Desarrollo Sostenible y Perspectiva de Género	ix
Índice.....	xi
Listado de abreviaturas	xvii
Índice de Figuras	xxi
Índice de tablas.....	xxvii
Índice de ecuaciones	xxvii
1. Introducción	1
1.1 La barrera hematoencefálica	1
1.1.1 Relevancia evolutiva de la barrera hematoencefálica	1
1.1.2 Evolución histórica del concepto y el estudio de la BHE	2
1.1.3 Composición de la BHE	3
1.1.3.1 Células endoteliales	4
1.1.3.2 Uniones estrechas	5
1.1.3.3 Pericitos	5
1.1.3.4 Astrocitos	5
1.1.3.5 Membrana basal.....	6
1.1.3.6 Microglía	6
1.1.4 Mecanismos de transporte habituales de la BHE	6
1.1.4.1 Difusión paracelular	7
1.1.4.2 Transcitosis transcelular	7
1.1.4.3 Transcitosis mediada por proteínas transportadoras.....	8
1.1.4.4 Transcitosis mediada por receptores.....	8
1.1.4.5 Transcitosis mediada por adsorción	8
1.1.4.6 Transcitosis mediada por células	8
1.1.4.7 Bombas de eflujo.....	9
1.1.5 Impacto de la BHE en el desarrollo terapéutico para enfermedades del SNC	9
1.1.6 Estrategias para la administración de medicamentos a través de la BHE	10
1.1.6.1 Métodos invasivos	10
1.1.6.1.1 <i>Disrupción de la BHE</i>	11
1.1.6.1.2 <i>La administración intratecal y administración intracraneal,</i>	12
1.1.6.1.3 <i>Administración por convección</i>	12
1.1.6.1.4 <i>Implante de dispositivos</i>	12
1.1.6.2 Métodos no invasivos	12
1.1.6.2.1 <i>Administración intranasal</i>	13
1.1.6.2.2 <i>Administración a través de vectores virales</i>	13
1.1.6.2.3 <i>Administración mediada por células</i>	13
1.1.6.2.4 <i>Administración de exosomas</i>	14
1.1.6.2.5 <i>Vectores de transporte</i>	14
1.1.6.2.6 <i>Inhibición de las bombas de eflujo</i>	14
1.1.6.2.7 <i>Utilización de nanotecnología para administrar medicamentos a través de la BHE</i> ..	14
1.1.7 Métodos para evaluar la permeabilidad a través de la BHE	15
1.1.7.1 Modelos <i>in silico</i>	15
1.1.7.2 Modelos <i>in vitro</i>	16
1.1.7.3 Modelos <i>in vivo</i>	16
1.1.7.4 Sistemas de “órgano en un chip”	17
1.2 Nanotecnología en el desarrollo de sistemas terapéuticos avanzados	20
1.2.1 Breve historia de la nanotecnología	20

1.2.2 Aplicaciones de la nanotecnología como sistemas de liberación de fármacos.....	22
1.2.3 Evolución del mercado farmacéutico de las nanopartículas	23
1.2.4 Tipos de nanomateriales empleados como sistemas de liberación de fármacos	25
1.2.4.1 Nanomateriales poliméricos	25
1.2.4.1.1 Dendrímeros.....	25
1.2.4.1.2 Nanopartículas poliméricas	26
1.2.4.1.3 Micelas	27
1.2.4.1.4 Conjugados fármaco-polímero.....	27
1.2.4.1.5 Nanopartículas proteicas	27
1.2.4.1.6 Nanogeles (o hidrogeles).....	28
1.2.4.3 Nanomateriales inorgánicos.....	28
1.2.4.3.1 Nanotubos de carbono	28
1.2.4.3.2 Nanodiamantes	28
1.2.4.3.3 Nanopartículas metálicas.....	28
1.2.4.3.4 Quantum Dots	28
1.2.4.3.5 Nanopartículas a Base de Sílica.....	29
1.2.4.4 Nanocristales	29
1.2.4.2 Nanomateriales lipídicos	29
1.2.4.2.1 Liposomas	30
1.2.4.2.2 Nanopartículas lipídicas sólidas	31
1.2.4.2.3 Transportadores lipídicos nanoestructurados	31
1.2.4.2.4 Nanopartículas de lípido ionizable.....	31
1.2.5 Métodos de fabricación de nanopartículas lipídicas	32
1.2.5.1 Métodos para la fabricación de SLNs y NLCs	33
1.2.5.2 Métodos para la fabricación de Liposomas y LNPs	33
1.2.6 Caracterización de nanopartículas lipídicas	36
1.2.7 Aplicación de QbD en el desarrollo de nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos	37
1.2.8 Desafíos actuales para el avance clínico de las nanopartículas	39
1.2.8.1 Desafíos en la aprobación regulatoria	40
1.2.8.2 Retos en la protección de la propiedad intelectual	41
1.2.8.3 Retos relacionados con los modelos de predicción preclínica.....	41
1.2.8.4 Retos relacionados con la facilidad de fabricación a escala industrial	42
1.2.9 Funcionalización de nanopartículas lipídicas	43
1.2.9.1 Agentes empleados para la funcionalización de nanopartículas	44
1.2.9.2 Estrategias para la incorporación de agentes de funcionalización.....	45
1.2.10 Nanopartículas lipídicas como sistemas para cruzar la BHE.....	47
1.2.11 Nanopartículas como vehículos para terapias de silenciamiento génico.....	50
1.2.11.1 Principios del silenciamiento génico mediado por siRNA	50
1.2.11.2 Historia de la aplicación terapéutica del silenciamiento génico	52
1.2.11.3 Silenciamiento génico como estrategia terapéutica en el SNC.....	53
1.2.11.5 Nanopartículas lipídicas como vehículos de entrega para siRNA	55
2. Objetivos.....	57
2.1 Objetivo principal	57
2.2 Objetivos Específicos	57
3. Materiales y métodos.....	59
3.1.1 Materiales	59
3.1.2 Equipos.....	64
3.1.2.1 Equipos empleados en la fabricación de las nanopartículas lipídicas	64
3.1.2.2 Equipos empleados en la purificación de las nanopartículas lipídicas	64
3.1.2.3 Equipo empleado en la liofilización de las nanopartículas.....	64

3.1.2.4 Equipo empleado para la caracterización de las nanopartículas lipídicas	65
3.1.2.5 Equipo utilizado en la evaluación del desempeño biológico de las LNPs	65
3.1.2.6 Equipo general de laboratorio utilizado a lo largo de las diferentes técnicas	66
3.2 Metodología y técnicas analíticas	67
3.2.1 Desarrollo de nanopartículas lipídicas	67
3.2.1.1 Preformulación de las nanopartículas lipídicas	67
3.2.1.2 Fabricación de nanopartículas	67
3.2.1.3 Purificación de nanopartículas	68
3.2.1.4 Liofilización de las nanopartículas lipídicas	69
3.2.2 Funcionalización de nanopartículas lipídicas	70
3.2.2.1 Preparación de muestra de nanopartículas	70
3.2.2.2 Preparación de la solución de péptidos	70
3.2.2.3 Incubación y purificación final	70
3.2.3 Caracterización de las nanopartículas lipídicas	70
3.2.3.1 Determinación del tamaño de partícula y PDI	70
3.2.3.2 Determinación del potencial zeta	71
3.2.3.3 Obtención de imágenes por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	72
3.2.3.4 Obtención de imágenes por microscopía de fuerza atómica (AFM)	72
3.2.3.5 Análisis mediante microscopía de luz interferométrica	72
3.2.3.6 Evaluación de la eficiencia de encapsulación	73
3.2.3.7 Identificación y cuantificación de materiales por HPLC-UV	74
3.2.3.8 Cuantificación de la maleimida disponible para la funcionalización	74
3.2.3.9 Cuantificación de péptidos mediante HPLC-UV por hidrólisis y derivatización de aminoácidos	75
3.2.3.10 Pruebas de pre-estabilidad de las nanopartículas lipídicas	76
3.2.4 Ensayos biológicos	76
3.2.4.1 Manejo y cultivo de las diferentes líneas celulares	76
3.2.4.1.1 Cultivo celular HEK 293T	76
3.2.4.1.2 Cultivo celular SH-SY5Y	77
3.2.4.1.3 Cultivo celular hCMEC/D3	77
3.2.4.1.4 Cultivo celular de células endoteliales derivadas de células progenitoras de sangre de cordón umbilical	78
3.2.4.1.5 Cultivo celular de pericitos	78
3.2.4.2 Evaluación de la viabilidad celular	78
3.2.4.3 Evaluación de la internalización de nanopartículas a través de microscopía confocal ..	79
3.2.4.4 Citometría de flujo	80
3.2.4.5 Experimentos de silenciamiento génico en células HEK 293T	80
3.2.4.6 Análisis de proteínas por Western Blot	81
3.2.4.6.1 Extracción de proteínas	81
3.2.4.6.2 Cuantificación del contenido proteico	81
3.2.4.6.3 Ejecución del Western Blot: Electroforesis, transferencia y detección de proteínas ...	81
3.2.4.7 Análisis de expresión génica por reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR)	82
3.2.4.7.1 Extracción de RNA	82
3.2.4.7.2 Conversión del RNA en cDNA y determinación de la concentración	82
3.2.4.7.3 qPCR en tiempo real	83
3.2.4.8 Modelo <i>in vitro</i> de BHE	83
3.2.4.8.1 Preparación del co-cultivo	83
3.2.4.8.2 Ejecución del ensayo	84
3.2.4.9 Modelo <i>in vivo</i>	85
3.3 Consideraciones metodológicas adicionales	87

3.3.1 Diseño de experimentos y configuraciones experimentales adicionales.....	87
3.3.1.1 Diseño de experimentos (DoE)	87
3.3.1.1.1 <i>DoE de formulación</i>	87
3.3.1.1.2 <i>DoE de proceso</i>	88
3.3.1.1.3 DoE para la incorporación de Maleimida.....	88
3.3.1.2 Configuraciones experimentales adicionales	88
3.3.2 Análisis estadístico de los datos	89
3.3.3 Consideraciones éticas	90
3.3.4 Contribuciones en el desarrollo de las actividades	90
3.3.5 Seguridad y manejo de residuos.....	91
4. Resultados.....	93
4.1 Desarrollo de las nanopartículas lipídicas	93
4.1.1.1 Establecimiento del perfil de calidad objetivo de producto.....	94
4.1.1.2 Análisis de riesgo de las nanopartículas lipídicas.....	96
4.1.2 Estudios de formulación para optimizar la distribución de tamaño de partícula y PDI	114
4.1.2.1 Efecto de la composición de la fase lipídica.....	114
4.1.2.2 Efecto de las soluciones tampón utilizadas para la manufactura y purificación de nanopartículas lipídicas	117
4.1.2.3 Efecto del flujo total y la proporción de flujo en función de la diálisis.....	119
4.1.3 Estudios de formulación para optimizar el potencial zeta	123
4.1.3.1 Efecto de la composición de la fase lipídica.....	123
4.1.3.2 Efecto de las soluciones tampón utilizadas para la manufactura y purificación de nanopartículas lipídicas.	125
4.1.3.3 Efecto del flujo total y la proporción de flujo en función de la diálisis.....	126
4.1.4 Estudio de la eficiencia de encapsulación y contenido de RNA	128
4.1.4.1 Efecto de la composición de la fase lipídica.....	128
4.1.4.2 Efecto de la diálisis.....	128
4.1.4.3 Efecto del flujo total y la proporción de flujo.....	129
4.1.5 Establecimiento y especificaciones de la fórmula y proceso de fabricación del prototipo base de LNPs.....	130
4.1.6 Estabilidad del prototipo	134
4.2 Funcionalización de las nanopartículas lipídicas	137
4.2.1 Modificación del prototipo para agregar el lípido maleimida.	137
4.2.1.1 Impacto de la adición del lípido funcional sobre el tamaño de partícula, el PDI, y potencial zeta del prototipo	137
4.2.1.2 Desarrollo metodológico para cuantificar la maleimida disponible	139
4.2.1.3 Análisis de la distribución de la maleimida para optimizar la selección del lípido funcional	142
4.2.2 Funcionalización con péptidos superficiales	149
4.2.2.1 Efecto del medio de incubación.....	149
4.2.2.2 Efecto del tiempo de incubación y la proporción maleimida/péptido.....	150
4.2.2.2.1 <i>Estudio en nanopartículas no dializadas</i>	151
4.2.2.3 Comparativa de la eficiencia de funcionalización empleando otros péptidos	152
4.2.3 Definición del protocolo de funcionalización	152
4.2.4 Efecto de la funcionalización en el tamaño de partícula, PDI y el potencial zeta	153
4.3 Evaluación del desempeño biológico de las nanopartículas lipídicas	158
4.3.1 Reformulación del prototipo para agregar lípido fluorescente	158
4.3.2 Evaluación de la viabilidad celular	159
4.3.3 Evaluación de la internalización celular	162
4.3.3.1 Citometría de flujo.....	162
4.3.3.2 Microscopía confocal	163

4.3.4 Pruebas de silenciamiento génico	163
4.3.5 Evaluación <i>in vitro</i> de la permeabilidad a través de la BHE	168
4.3.6 Evaluación <i>in vivo</i> de la permeabilidad a través de la BHE	169
4.3.6.1 Biodistribución de las nanopartículas sin funcionalizar	169
4.3.6.2 Biodistribución de las nanopartículas funcionalizadas	172
5. Discusión	181
6. Conclusiones.....	205
7. Bibliografía	209
8. Anexos	276
Anexo 1: Información Suplementaria.....	278
Anexo 2: Publicaciones realizadas en revistas indexadas	298
Anexo 3: Participación en congresos.....	374

Listado de abreviaturas:

AFM: Microscopía de Fuerza Atómica (Atomic Force Microscopy)
ASO: Oligonucleótidos antisentido (antisense oligonucleotide)
ATP: Adenosin trifosfato
BBB: Barrera Hematoencefálica (blood-brain barrier)
BCRP: Proteína de resistencia del cáncer de mama (Breast Cancer Resistance Protein)
BHE: Barrera Hematoencefálica
BET: Brunauer-Emmett-Teller
BL: Lámina basal
CART: Árboles de clasificación y regresión (Classification and Regression Tree)
CCiTUB: Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona
CE: Células endoteliales
CPP: Parámetros Críticos de Proceso (Critical Process Parameters)
CQA: Atributos Críticos de Calidad (Critical Quality Attributes)
CRISPR-Cas9: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas - Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - Cas9)
Cryo-TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión Criogénica (Cryogenic Transmission Electron Microscopy)
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DCS: Sedimentación Centrífuga Diferencial (Differential Centrifugal Sedimentation)
DLS: Dispersión Dinámica de Luz (Dynamic Light Scattering)
Dlin-MC3-DMA: Dilinoleilmetil-4-dimetilaminobutirato
DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DOTAP: 1,2-Dioleil-3-trimetilamonio-propano
DSPC: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DSPE-mPEG: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol
DSPE-mPEG-Cy5: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol (conjugado con el fluoróforo Cy5)
DTA: Análisis Térmico Diferencial (Differential Thermal Analysis)
EBSD: Difracción de Electrones Retrodispersados (Electron Backscatter Diffraction)
ECGS: Suplementos de crecimiento para células endoteliales
ECs: células endoteliales (Endothelial cells)
EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA: Ácido etilen di-amino tetraacético
EE: Eficiencia de Encapsulación
EELS-STEM: Espectroscopía de Pérdida de Energía de Electrones en Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (Electron Energy Loss Spectroscopy in Scanning Transmission Electron Microscopy)
EGF: Factor de crecimiento epidérmico
EMA: Agencia Europea del Medicamento (European Medicines Agency)
EPLS: Espectroscopía Mejorada de Fase Bloqueada (Enhanced Phase-Locked Spectroscopy)

EPM: Movilidad Electroforética (Electrophoretic Mobility)

EXAFS: Estructura Fina de Absorción de Rayos X Extendida (Extended X-ray Absorption Fine Structure)

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration)

FMR: Resonancia Ferromagnética (Ferromagnetic Resonance)

FTIR: Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)

FRR: Relación de Flujo (Flow Rate Ratio)

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GMP: Buenas Prácticas de Manufactura (Good Manufacturing Practices)

LAT: Transportador de aminoácidos grandes (Large-Aminoacid Transporter)

HEK 293T: Células de Riñón Embrionario Humano 293T (Human Embryonic Kidney 293T Cells)

HPLC-UV: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con Detección Ultravioleta (High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection)

hCMEC/D3: Línea Celular Endotelial Derivada de Microvasos del Lóbulo Temporal Humano

HRTEM: Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (High-Resolution Transmission Electron Microscopy)

ICH: Conferencia Internacional sobre armonización (International Council for Harmonisation)

ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

ICP-OES: Espectroscopía de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy)

ifc: Intensidad de fluorescencia corregida

IPBLN-CSIC: Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”

iPSCs: Células madre pluripotentes inducibles (inducible Pluripotent Stem Cells)

IVIS: Sistema de Imagen In Vivo (In Vivo Imaging System)

LEIS: Dispersión de Iones de Baja Energía (Low Energy Ion Scattering)

LNPs: Nanopartículas de lípido ionizable

LRP1: Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad Relacionado con la Proteína 1 (Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1)

MALDI: Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

MgFM: Microscopía de Fuerza Magnética (Magnetic Force Microscopy)MiniAp-4: Péptido Derivado del Ap-4

MM-MEMS: Medición de Masa Resonante - Sistemas MicroElectroMecánicos (Resonant Mass Measurement - MicroElectroMechanical Systems)mRNA: RNA Mensajero (Messenger RNA)

mRNA: RNA mensajero

NHS: N-hidroxisuccinimida

NLC: Nanopartículas Lipídicas con Núcleo Electrodenso (Nanostructured Lipid Carriers)

NMR: Resonancia Magnética Nuclear (Nuclear Magnetic Resonance)

NTA: Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis)

OoC: Órgano en un chip (organ on a chip)

Papp: Permeabilidad aparente
 PDI: Índice de Polidispersidad (Polydispersity Index)
 PBS: Solución Salina Amortiguada con Fosfatos (Phosphate Buffered Saline)
 PCL: poly(ϵ -caprolactona)
 PEG: Polietilenglicol
 PEG-MAL: Maleimida-PEG (Maleimide-PEG)
 PL: Fotoluminiscencia (Photoluminescence)
 PLA: ácido (D,L) poliláctico
 PGLA: ácido poli(D,L-lactic-co-glicólico)
 P-gp: Glicoproteína-P
 PTA: Análisis de Seguimiento de Partículas (Particle Tracking Analysis)
 QbD: Calidad por Diseño (Quality by Design)
 qPCR: Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa
 QTPP: Perfil de Calidad del Producto (Quality Target Product Profile)
 RFU: Unidades relativas de fluorescencia (Relative fluorescence units)
 RNA: Ácido Ribonucleico
 RVG: Péptido de Glicoproteína del Virus de la Rabia (Rabies Virus Glycoprotein)
 SANS: Dispersión de Neutrones a Pequeño Ángulo (Small Angle Neutron Scattering)
 SAXS: Dispersión de Rayos X a Pequeño Ángulo (Small Angle X-ray Scattering)
 SDS: Dodecilsulfato sódico
 SEM: Microscopía Electrónica de Barrido (Scanning Electron Microscopy)
 SEM-EDX: Microscopía Electrónica de Barrido con Espectroscopía de Rayos X de Energía Dispersiva (Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy)
 SH-SY5Y: Línea Celular de Neuroblastoma Humano SH-SY5Y
 siGFP: RNA Interferente Pequeño contra la Proteína Verde Fluorescente (Small Interfering GFP RNA)
 SIMS: Espectrometría de Masas de Iones Secundarios (Secondary Ion Mass Spectrometry)
 siRNA: RNA Interferente Pequeño (Small Interfering RNA)
 siTCERG1: RNA Interferente Pequeño contra el Gen del Factor de Elongación de Transcripción y Empalme Empalme (Transcription Elongation and Splicing Factor 1)
 SNC: Sistema Nervioso Central
 SLN: Nanopartículas Lipídicas Sólidas (Solid Lipid Nanoparticles)
 Sp-ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente de Partícula Única (Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)
 SQUID: Dispositivo de Interferencia Cuántica Superconductor (Superconducting Quantum Interference Device)
 STEM: Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (Scanning Transmission Electron Microscopy)
 TCERG1: Gen del Factor de Elongación de Transcripción y Empalme (Transcription Elongation and Splicing Factor 1)
 TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión (Transmission Electron Microscopy)
 TEER: Resistencia transendotelial (TransEndothelial Electric Resistance)
 TF: Tasa de Flujo (Total Flow)

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
TGA: Análisis Termogravimétrico (Thermogravimetric Analysis)
THRre – Péptido Retro-Enantiómero del Receptor de Transferrina Humana
tRNA: RNA de Transferencia (Transfer RNA)
TRPS: Medición de Pulso Resistivo Ajustable (Tunable Resistive Pulse Sensing)
UNV: Unidad neurovascular
UV-Vis: Espectroscopía Ultravioleta-Visible (Ultraviolet-Visible Spectroscopy)
UV-Vis-NIR: Espectroscopía Ultravioleta-Visible-Infrarrojo Cercano (Ultraviolet-Visible-Near Infrared Spectroscopy)
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
VSM: Magnetómetro de Muestra Vibrante (Vibrating Sample Magnetometer)
XMCD: Dicroísmo Circular Magnético de Rayos X (X-ray Magnetic Circular Dichroism)
XPS: Espectroscopía de Fotoelectrones de Rayos X (X-ray Photoelectron Spectroscopy)
XRD: Difracción de Rayos X (X-ray Diffraction)
 γ -GT: Gamma glutamil transpeptidasa (γ -GlutamylTranspeptidase)

Índice de Figuras

Figura 1: Hitos en la investigación y evolución del concepto de la BHE	3
Figura 2: Conformación de la unidad neuro-vascular.	4
Figura 3: Mecanismos de transporte presentes en la BHE.	7
Figura 4: Clasificación de los métodos aplicados para transportar medicamentos a través de la BHE.	11
Figura 5: Esquema de selección para el tipo de modelo para evaluar la permeabilidad a través de la BHE.	19
Figura 6: Hitos en la historia moderna de la nanotecnología	21
Figura 7: Evolución de la aprobación de medicamentos basados en nanotecnología (1955-2021)	24
Figura 8: Clasificación de los productos nanotecnológicos comercializados actualmente	24
Figura 9: Clasificación de los productos nanotecnológicos contempando todo el ciclo de vida del medicamento	26
Figura 10: Tipos de nanomateriales empleados como sistemas de liberación de fármacos.....	27
Figura 11: Tipos de nanopartículas lipídicas empleadas como sistemas de liberación de fármacos.....	30
Figura 12: Subtipos de transportadores lipídicos nanoestructurados	32
Figura 13: Diseños básicos de chips para mezcla microfluídica	35
Figura 14: Variables del proceso de mezcla microfluídica	35
Figura 15: Pasos generales de la implementación de un enfoque por QbD en un desarrollo farmacéutico	38
Figura 16: Principales obstáculos en el lanzamiento de productos farmacéuticos basados en la nanotecnología.....	39
Figura 17: Perspectivas para afrontar los desafíos en la traslación clínica de la nanomedicina	40
Figura 18: estrategias base para la incorporación de ligandos en nanopartículas lipídicas	45
Figura 19: Reacción entre maleimida y grupos tiol.....	46
Figura 20: Estrategias de funcionalización en nanopartículas lipídicas para atravesar la BHE...	48
Figura 21: Mecanismo de acción del siRNA	51
Figura 22: Línea de tiempo de los lanzamientos de productos basados en silenciamiento génico	52
Figura 23: Escape endosomal de nanopartículas de lípido ionizable.....	55
Figura 24: Diagrama de la fabricación y purificación de nanopartículas lipídicas	69
Figura 25: Principio fundamental y evaluación del potencial zeta	71
Figura 26: Diagrama de un equipo de microscopía de luz interferométrica	73
Figura 27: Representación de la estructura y funcionamiento de un microscopio confocal	79
Figura 28: Representación del modelo in vitro de BHE	84
Figura 29: Comparación del tamaño de partícula obtenidas con diferentes concentraciones de lípidos totales y diferentes lípidos ionizables	115
Figura 30: Comparación del PDI obtenido con diferentes concentraciones de lípidos totales y diferentes lípidos ionizables.....	115
Figura 31: Efectos principales de la concentración de lípidos totales y el tipo de lípido ionizable en el tamaño de partícula y el PDI	116
Figura 32: Efecto del cambio de proporción de los lípidos en el tamaño de partícula y el PDI	116
Figura 33: Gráfica de rastreo de respuesta de COX para los cambios en los componentes lipídicos.....	116

Figura 34: Influencia de la composición de la fase acuosa empleada en la fabricación de nanopartículas lipídicas por mezcla micro fluidica sobre el tamaño de partícula	117
Figura 35: Influencia de la composición de la fase acuosa empleada en la fabricación de nanopartículas lipídicas por mezcla micro fluidica sobre el PDI	118
Figura 36: Comparación del tamaño de partícula obtenido tras la purificación de las nanopartículas con diferentes soluciones de diálisis	118
Figura 37: Comparación del PDI obtenido tras la purificación de las nanopartículas con diferentes soluciones de diálisis.....	119
Figura 38: Efectos del flujo total (TF), la proporción de flujo (FRR) y la ejecución de diálisis sobre el tamaño de partícula y el PDI de nanopartículas lipídicas	120
Figura 39: Diagrama de contorno de la distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas.....	120
Figura 40: Gráficas de Pareto para los efectos estandarizados sobre el tamaño de partícula .	121
Figura 41: Gráficas de interacción sobre el tamaño de partícula	121
Figura 42: Gráficas de Pareto para los efectos estandarizados sobre el PDI	122
Figura 43: Gráficas de interacción sobre el PDI	122
Figura 44: Comparación del potencial zeta obtenido en nanopartículas preparadas con diferentes tipos de lípido ionizable/catiónico.....	124
Figura 45: Efecto del cambio de proporción de los lípidos en el potencial zeta.....	124
Figura 46: Influencia de la composición de la fase acuosa empleada en la fabricación de nanopartículas lipídicas por mezcla micro fluidica sobre el potencial zeta.....	125
Figura 47: Comparación del potencial zeta observado tras la diálisis ejecutada con condiciones diferentes	125
Figura 48 Efectos del flujo total (TF), la proporción de flujo (FRR) y la ejecución de diálisis sobre el potencial zeta	126
Figura 49: Gráficas de Pareto para los efectos estandarizados sobre el potencial zeta.....	127
Figura 50: Gráficas de interacción sobre el potencial zeta	127
Figura 51: Efecto de la composición de la fase lipídica en la cantidad de RNA encapsulado y la EE.....	128
Figura 52: Efecto de la diálisis en el contenido de RNA y la EE	129
Figura 53: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas lipídicas	131
Figura 54: Imágenes TEM de las nanopartículas lipídicas	132
Figura 55: Imágenes de AFM de las nanopartículas.....	133
Figura 56: Tamaño de partícula durante el estudio de estabilidad de cuatro semanas.....	134
Figura 57: PDI durante el estudio de estabilidad de cuatro semanas.....	135
Figura 58: Eficiencia de encapsulación durante el estudio de estabilidad de cuatro semanas	135
Figura 59: Concentración de RNA durante el estudio de estabilidad de cuatro semanas.....	136
Figura 60: Impacto de la incorporación de lípido funcional en el tamaño de partícula	138
Figura 61: Impacto de la incorporación de lípido funcional en el PDI	138
Figura 62: Cuantificación del lípido maleimida mediante HPLC-UV en nanopartículas con diferentes lípidos funcionales y condiciones de purificación	142
Figura 63: Disponibilidad superficial de maleimida en diferentes formulaciones de nanopartículas después de la diálisis con tampón de citrato 5 mM, pH 5,5.	143
Figura 64: Tendencia de la concentración superficial de maleimida según el porcentaje de lípido ionizable para el DSPE-mPEG-MAL y el Colesterol-mPEG-MAL	144
Figura 65: Distribución del lípido maleimida dentro de la formulación de nanopartículas según el tipo de lípido funcional y el porcentaje utilizado	144

Figura 66: Gráfica de efectos principales del tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se ubica en la superficie de la nanopartícula	145
Figura 67: Gráfica de interacción entre el tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se ubica en la superficie de la nanopartícula	146
Figura 68: Gráfica de efectos principales del tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se ubica en el interior de la nanopartícula.....	146
Figura 69: Gráfica de interacción entre el tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se ubica en el interior de la nanopartícula	147
Figura 70: Gráfica de efectos principales del tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se queda en el líquido sobrenadante.....	147
Figura 71: Gráfica de interacción entre el tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se queda en el líquido sobrenadante	148
Figura 72: Efecto del pH del medio de incubación en la en la eficiencia de funcionalización..	150
Figura 73: Maleimida remanente sin reaccionar después de la incubación de nanopartículas sin diálisis con distintas proporciones de péptido.....	151
Figura 74: Eficiencia de funcionalización con los péptidos RVG, THRre y Angiopep2	152
Figura 75: Impacto de la incorporación de diferentes péptidos en el tamaño de partícula.....	154
Figura 76: Gráficas de intervalo de confianza del análisis de varianza del tamaño de partícula con diferentes péptidos.	154
Figura 77: Impacto de la incorporación de diferentes péptidos en el PDI.....	155
Figura 78: Gráficas de intervalo de confianza del análisis de varianza del PDI con diferentes péptidos.....	155
Figura 79: Impacto de la incorporación de diferentes péptidos en el potencial zeta.	156
Figura 80: Gráficas de intervalo de confianza del análisis de varianza del potencial zeta con diferentes péptidos.	156
Figura 81: Impacto de la incorporación de lípido fluorescente en el tamaño de partícula.	158
Figura 82: Impacto de la incorporación de lípido fluorescente en el PDI.	159
Figura 83: Impacto de la incorporación de lípido fluorescente en el potencial zeta.....	159
Figura 84: Evaluación de la viabilidad celular en células HEK 293T expuestas a volúmenes de una suspensión de nanopartículas lipídicas con $4,03 \times 10^{11}$ nanopartículas por mililitro.	160
Figura 85: Evaluación de la viabilidad celular en células HEK 293T expuestas a volúmenes de una suspensión de nanopartículas lipídicas con $5,04 \times 10^{10}$ nanopartículas por mililitro.	161
Figura 86: Análisis de citometría de flujo para la evaluación de la internalización de nanopartículas por las células HEK 293T.....	162
Figura 87: Evaluación de la internalización de nanopartículas en células HEK 293T por de microscopía confocal.....	164
Figura 88: Evaluación de la internalización de nanopartículas en células hCMEC/D3 por microscopía confocal.....	165
Figura 89: Evaluación de la internalización de nanopartículas en células SH-SY5Y por microscopía confocal.....	166
Figura 90: Análisis de <i>Western Blot</i> para evaluar el silenciamiento génico mediante las nanopartículas lipídicas.....	167
Figura 91: Evaluación cuantitativa de la expresión del gen TCERG1 Mediante qPCR.....	167
Figura 92: Evaluación comparativa de la permeabilidad aparente a través del modelo <i>in vitro</i> de BHE de las nanopartículas funcionalizadas con diferentes péptidos.....	168
Figura 93: Evaluación mediante imágenes <i>in vivo</i> de la biodistribución durante 2 horas de nanopartículas sin funcionalizar. Ratón 1.	169

Figura 94: Evaluación mediante imágenes <i>in vivo</i> de la biodistribución durante 6 horas de nanopartículas sin funcionalizar. Ratón 2.	170
Figura 95: Evaluación mediante imágenes <i>in vivo</i> de la biodistribución durante 24 horas de nanopartículas sin funcionalizar. Ratón 3.	170
Figura 96: Fluorescencia total captada durante la prueba de biodistribución de nanopartículas sin funcionalización durante 24 horas.	171
Figura 97: Acumulación de nanopartículas sin funcionalizar en cerebros de ratones 2, 6 y 24 horas post- administración.	172
Figura 98: Evaluación mediante imágenes <i>in vivo</i> de la biodistribución durante 24 horas de nanopartículas funcionalizadas con péptido RVG.....	173
Figura 99: Evaluación mediante imágenes <i>in vivo</i> de la biodistribución durante 24 horas de nanopartículas funcionalizadas con péptido MiniAp-4.....	174
Figura 100: Evaluación mediante imágenes <i>in vivo</i> de la biodistribución durante 24 horas de nanopartículas cuya maleimida libre fue bloqueada por cisteína.	175
Figura 101: Intensidad de fluorescencia corregida durante la prueba de biodistribución durante 24 horas de nanopartículas funcionalizadas con RVG, MiniAp-4 y con la maleimida libre bloqueada por cisteína.....	177
Figura 102: Acumulación de nanopartículas funcionalizadas con RVG, MiniAp-4 y con la maleimida libre bloqueada por cisteína en cerebros de ratones 2, 6 y 24 horas post- administración.....	178

Índice de tablas

Tabla 1: Características críticas en nanopartículas y técnicas analíticas disponibles	36
Tabla 2: Excipientes utilizados para la fabricación de las nanopartículas lipídicas.....	59
Tabla 3: Otros materiales utilizados durante la fabricación de las nanopartículas lipídicas.	60
Tabla 4: Secuencias de RNA utilizadas para su encapsulación y pruebas de silenciamiento	60
Tabla 5: Péptidos utilizados para la funcionalización de las nanopartículas lipídicas.	60
Tabla 6: Materiales utilizados para la caracterización de las nanopartículas lipídicas.	61
Tabla 7: Líneas celulares utilizadas para la evaluación biológica de las nanopartículas lipídicas.	61
Tabla 8: Anticuerpos empleados en el análisis de <i>Western blot</i>	62
Tabla 9: Oligonucleótidos empleados en el análisis de qPCR	62
Tabla 10: Medios de cultivo y otros reactivos utilizados para la evaluación biológica de las nanopartículas lipídicas (continúa)	62
Tabla 11: Composición del vehículo lipídico preseleccionado para la fabricación de nanopartículas lipídicas.....	68
Tabla 12: Fases de la liofilización de las suspensiones de nanopartículas lipídicas para su deshidratación con fines analíticos.....	69
Tabla 13: Esquema de dosis y manejo de ratones empleados para los estudios de biodistribución en el modelo <i>in vivo</i> de las nanopartículas lipídicas.	86
Tabla 14: Límites para componentes en los diseños de experimentos de mezcla.	88
Tabla 15: Factores evaluados en el DoE de condiciones de fabricación.....	88
Tabla 16: Factores experimentales y variables de respuesta evaluadas con diseños experimentales adicionales.....	89
Tabla 17: Pruebas preliminares de preparación de nanopartículas para la selección del tipo de vehículo y método de fabricación.....	93
Tabla 18: Definición del QTPP para la formulación de LNPs para la vehiculización de siRNA a través de la BHE (continúa).....	94
Tabla 19: Análisis de riesgo inicial para parámetros de formulación de nanopartículas lipídicas para la vehiculización de siRNA a través de la BHE.....	97
Tabla 20: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de composición de la fase lipídica.....	98
Tabla 21: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de tipo de lípidos maleimida.....	99
Tabla 22: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación del porcentaje del lípidos maleimida.	100
Tabla 23: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de tipo de agente de funcionalización.	101
Tabla 24: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de proporción maleimida/péptido.....	102
Tabla 25: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de composición del medio de incubación.....	103
Tabla 26: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de composición de las soluciones tampón para fabricación y purificación.....	104
Tabla 27: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación del pH de las soluciones tampón utilizadas para la fabricación y purificación.	105
Tabla 28: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de cantidad de siRNA a incorporar.	106

Tabla 29: Análisis de riesgo inicial para parámetros críticos de proceso (CPP) de nanopartículas lipídicas para la vehiculización de siRNA a través de la BHE.	107
Tabla 30: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de flujo total (TF)	108
Tabla 31: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de la proporción de flujo (FRR)	109
Tabla 32: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de tipo y diseño del chip de mezcla.....	110
Tabla 33: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de ejecución de la diálisis.	111
Tabla 34: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de duración del protocolo de la diálisis.	112
Tabla 35: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de tiempo de incubación durante la funcionalización.	113
Tabla 36: Definición del prototipo de nanopartículas lipídicas desarrollado	130
Tabla 37: Atributos de calidad del prototipo de nanopartículas desarrollado	130
Tabla 38: Condiciones analíticas experimentadas en el desarrollo del método de evaluación de la composición de las nanopartícula lipídicas	140
Tabla 39: Descripción del gradiente aplicado para los métodos 18 y 22 para el desarrollo del método de evaluación de la composición de la nanopartícula lipídica	141
Tabla 40: Tiempos de retención de los componentes lipídicos bajo las diferentes condiciones analíticas experimentadas	141
Tabla 41: Distribución porcentual de la maleimida dentro de la formulación de nanopartículas según el tipo de lípido funcional y el porcentaje utilizado	145
Tabla 42: Seguimiento por HPLC-UV de la reacción de funcionalización bajo distintas condiciones	150
Tabla 43. Condiciones de funcionalización de las nanopartículas lipídicas	153
Tabla 44: Valores de intensidad de fluorescencia <i>ex vivo</i> de órganos extraídos de animales 2, 6 y 24 horas post-administración.....	171
Tabla 45: Valores de intensidad de fluorescencia corregida <i>ex vivo</i> de órganos extraídos de animales 2, 6 y 24 horas post-administración de nanopartículas nanopartículas funcionalizadas con RVG, MiniAp-4 y con la maleimida libre bloqueada por cisteína.....	177

Índice de ecuaciones

Ecuación 1: Eficiencia de Encapsulación	74
Ecuación 2: Cálculo de la maleimida sobrenadante.....	74
Ecuación 3: Cálculo de la maleimida encapsulada.....	75
Ecuación 4: Eficiencia de funcionalización	76
Ecuación 5: Ecuación de Pfaffl.....	83
Ecuación 6: Permeabilidad aparente	85
Ecuación 7: Intensidad de fluorescencia corregida (ifc).....	87

1. Introducción

1.1 La barrera hematoencefálica

1.1.1 Relevancia evolutiva de la barrera hematoencefálica

A lo largo de más de 580 millones de años, el sistema nervioso de los animales ha evolucionado de forma tan diversa como las mismas especies que lo poseen (1). El sistema Nervioso Central (SNC) puede coordinar desde las funciones corporales más básicas (2) hasta añadir control sobre patrones de comportamiento e incluso permitir las funciones cognitivas superiores para los SNC más elaborados (3).

Los seres humanos se diferencian de otros animales por su capacidad para el lenguaje, la abstracción, la comprensión y modificación del entorno, la creación de arte y ciencia, así como la habilidad para experimentar e interpretar sentimientos, los cuales moldean la complejidad de las interacciones sociales (1,4). Estas y otras características son fruto de la extraordinaria especialización del SNC (5,6).

La evolución del SNC se ha dado a través de la diversificación y especialización celular, y la compartimentalización de las funciones acorde a dicha especialización (7,8). Se ha teorizado que la aparición de un SNC más complejo generó una presión evolutiva que llevó a la selección natural a favorecer la formación de conjuntos de tejido, cada vez más complejos, que permitieran el intercambio de sustancias con la circulación sanguínea, a la vez que surgieran como protección del tejido cerebral ante posibles efectos nocivos de sustancias externas (9,10). Este tipo de tejido crítico para la homeostasis cerebral se le conoce por el nombre de Barrera Hematoencefálica (BHE) (11–13).

Todos los animales vertebrados actualmente descritos poseen una barrera celular especializada que controla el tráfico molecular desde la circulación sistémica hacia el tejido cerebral (14). Adicionalmente, estructuras de barrera primitivas pueden ser observadas en otros tipos de animales como algunas especies de moscas, peces cartilaginosos y cefalópodos (15,16). Mientras que estas estructuras primitivas pueden estar conformadas de forma sencilla, contando con tan solo uno, o pocos componentes (11), el cerebro de los primates superiores -y más notablemente, el del ser humano- muestra estructuras complejas de BHE que están compuestas por una red de componentes celulares y extracelulares. La variedad de componentes celulares incluye diversos subtipos de variables celulares con funciones especializadas (17,18).

La presencia de la BHE representa una significativa ventaja evolutiva (4,19,20), respaldada por evidencia científica que sugiere que los mecanismos de barrera son un rasgo de evolución ancestral (15,20). Este rasgo que se conserva a través de varias categorías taxonómicas, y se ha demostrado que la baja permeabilidad ante agentes extraños es una característica del cerebro en desarrollo que tiene su origen desde los primeros estadios embrionarios (10,14,21,22).

Desde esta perspectiva evolutiva, se puede afirmar que la aparición de una BHE más compleja correlaciona con la aparición de un SNC más sofisticado, lo que a su vez ha permitido el desarrollo de una mayor capacidad cognitiva y funcional. Esta misma complejidad cognitiva presente en el cerebro humano ha permitido empezar a desentrañar los mecanismos relacionados con la BHE e iniciar un camino científico que busca su entendimiento, apoyado por años de avances científicos y tecnológicos.

1.1.2 Evolución histórica del concepto y el estudio de la BHE

La existencia de una barrera que confiere una permeabilidad limitada al paso de sustancias desde la circulación sistémica hacia el tejido cerebral es un concepto que comenzó a construirse a finales del siglo XIX (23). Algunas de las primeras observaciones documentadas sobre la distribución selectiva de diferentes tipos de colorantes administrados sistémicamente a roedores fueron realizadas por el científico alemán Paul Ehrlich (21,24). En sus estudios, Ehrlich empleó diferentes colorantes para estimar el consumo de oxígeno en diferentes órganos y observó que ciertos colorantes se distribuían hacia todos los tejidos a excepción del cerebro de los ratones (22). Aunque algunos le atribuyen el descubrimiento de la BHE, cabe resaltar que las conclusiones elaboradas por Ehrlich apuntaban a diferencias de afinidad en vez de a la presencia de una barrera selectiva (21). De esta manera, lo más acertado es afirmar que Ehrlich descubrió los efectos o fenómenos asociados a la presencia de la BHE (nunca utilizó dicha expresión), más que la barrera misma (22).

Inspiradas por las observaciones de Ehrlich, las investigaciones realizadas inmediatamente después permitieron la conceptualización formal de la BHE, así como su mejor entendimiento. La hipótesis de la afinidad fue refutada gracias a las investigaciones de Edwin Goldman, discípulo de Ehrlich. Goldman demostró que los colorantes que no lograban teñir el cerebro tras su administración sistémica sí conseguían hacerlo cuando se inyectaban directamente en el tejido cerebral. Curiosamente, cuando estos colorantes se administraban directamente al cerebro, la tinción del tejido periférico casi no se observaba (22).

El término BHE ha sido atribuido a otro científico alemán: Max Lewandowsky (21,24), quien determinó en sus estudios con ratones que diferentes neurotoxinas presentaban efectos tóxicos en dosis considerablemente menores cuando eran inyectadas directamente en el cerebro, comparado con la administración por vía sistémica (22). Por su parte, los estudios de Lisa Stern y colaboradores constituyeron a la proposición formal de la BHE y su concepto, gracias a sus estudios relacionados con el movimiento de sustancias de la circulación periférica hacia el cerebro. Estos últimos permitieron elaborar la conclusión de que las células endoteliales (CE) del cerebro poseían una doble función, ofreciendo protección al SNC mientras que simultáneamente lo asisten desde el punto de vista metabólico (25).

El desarrollo de la microscopía electrónica representó un hito para el estudio de los fenómenos constitutivos y funcionales de la BHE, así como su inequívoca localización en los capilares que forman parte de la vascularización cerebral (24–26). La posibilidad de llevar a cabo diseños experimentales de mayor complejidad durante la segunda mitad del siglo XX permitió a diversos grupos de investigación ampliar significativamente el conocimiento existente sobre la BHE.

Por ejemplo, Tomas Reese y Morris Karnovsky demostraron, entre otros aportes relevantes, la existencia y funcionalidad de uniones estrechas (en inglés, *tight junctions*) en medio de las CE (27,28). El trabajo de otros grupos de investigación, liderados por científicos como Edward Dempsey y George Wislocki (29), V.L. Van Breemen y C. Clemente (30), Sarah Luse (31), Milton Brighman (32) o Christian Crone (33), contribuyó de manera significativa al conocimiento sobre la anatomía funcional, las vías de comunicación intercelulares, y los sistemas de transporte esenciales para el funcionamiento de la BHE (13), así como de algunos fenómenos que describen sus características de permeabilidad, como la resistencia eléctrica trans-endotelial (33).

El avance en este campo de conocimiento demostró que la BHE estaba compuesta por una compleja red de componentes celulares y extracelulares íntimamente coordinados. Esto llevó a la adopción del concepto de la unidad neuro-vascular (UNV) a principios de la década de los años

2000 (18,34). La adopción de la UNV como unidad anatómo-funcional de la BHE fue rápidamente aceptada por la comunidad científica, generando una atención que ha resultado en posteriores avances significativos en el campo de la neurociencia (35).

La suma de las contribuciones de numerosos equipos de investigación, impulsada por el advenimiento de nuevas tecnologías y disciplinas, ha enriquecido el entendimiento de la BHE. Esta es la base sobre la que se han abierto nuevos nichos de investigación, tanto en el entendimiento de su valor evolutivo, como en el desarrollo de estrategias que permitan superar los desafíos de permeabilidad. La Figura 1 no solo destaca la secuencia de descubrimientos alcanzados hasta la fecha, sino que a su vez sugiere un futuro con hitos pendientes de descubrir. Estos hitos podrían ser la clave para abrir nuevas puertas en la comprensión de la barrera hacia el SNC.

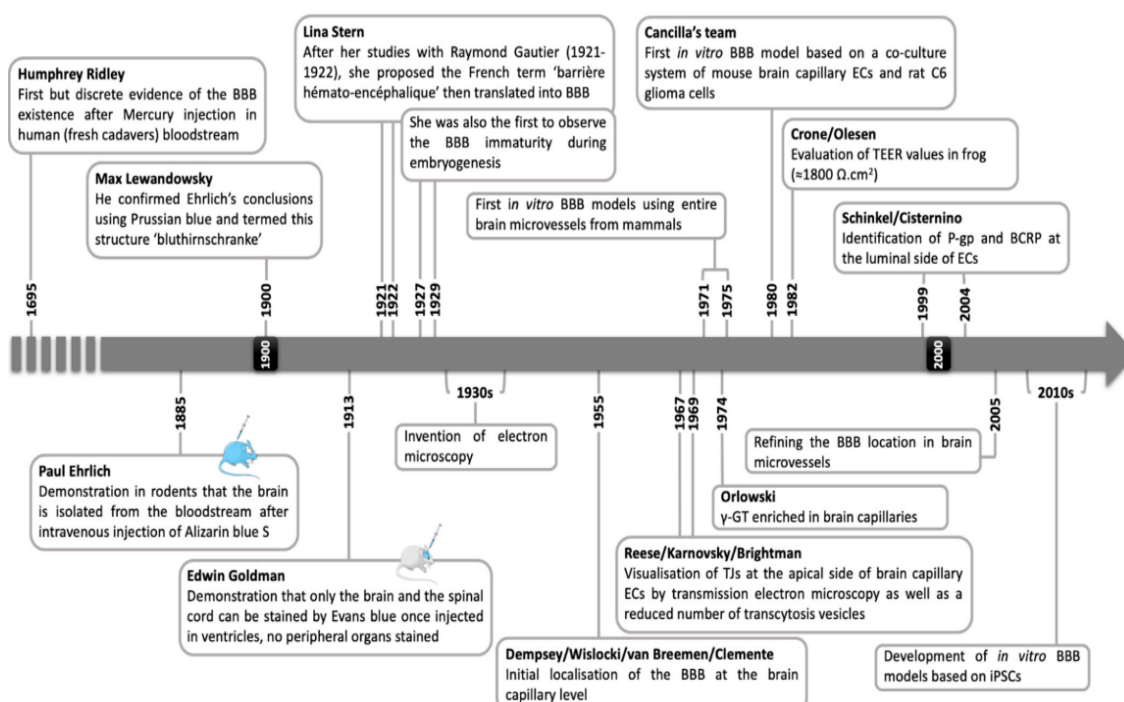


Figura 1: Hitos en la investigación y evolución del concepto de la BHE

Abreviaturas: BBB: *Blood-Brain Barrier* (barrera hematoencefálica); BCRP: *Breast Cancer Resistance Protein* (proteína de resistencia del cáncer de mama); ECs: *Endothelial Cells* (células endoteliales); iPSCs: *inducible Pluripotent Stem Cells* (células madre pluripotentes inducibles); P-gp: *P-glycoprotein* (glicoproteína – P); TEER: *TransEndothelial Electric Resistance* (resistencia transendotelial), γ -GT: γ -*GlutamylTranspeptidase* (gamma glutamil transpeptidasa). Imagen reproducida de (13) ®.

1.1.3 Composición de la BHE

Las propiedades de la permeabilidad de la BHE son indispensables para el mantenimiento de la homeostasis del SNC, favoreciendo el paso de oxígeno y nutrientes (36), mientras que impide el paso de toxinas y patógenos (37,38). Esta permeabilidad selectiva es fruto de la compleja composición de la UNV (34,39), el componente anatómico y funcional de la BHE (Figura 2).(18,34,35). Células endoteliales, pericitos, astrocitos, neuronas y miocitos, junto con varios componentes extracelulares, son los responsables de integrar y regular las interacciones entre el cerebro y la circulación sanguínea, asegurando la protección del SNC y el cumplimiento de sus requerimientos metabólicos (18).

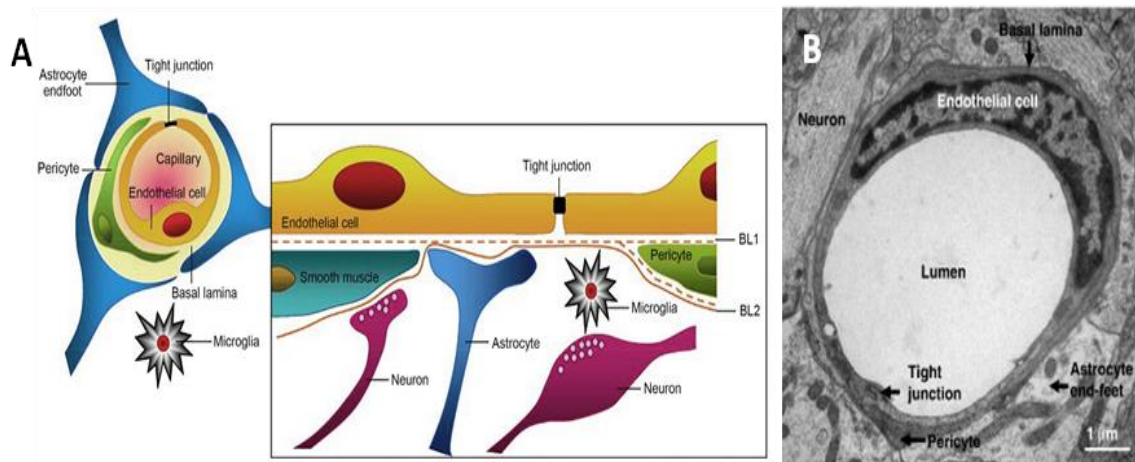


Figura 2: Conformación de la unidad neuro-vascular.

A: Las uniones estrechas (en inglés, *tight junctions*) generan cierres que limitan el paso de sustancia en medio de las células endoteliales, mientras que los pericitos rodean en endotelio de forma discontinua. Una membrana basal (indicadas como BL1 y BL2) envuelven a los pericitos y células endoteliales, rodeada a su vez por los astrocitos, que inducen y mantienen las propiedades de barrera. Las neuronas segregan neurotransmisores vasoactivos que regulan el flujo sanguíneo, mientras que la microglía está involucrada en la función inmune (12). B: Imagen de microscopía electrónica de un corte transversal de un vaso sanguíneo de rata mostrando los componentes de la UNV y el espacio luminal (40). Imágenes reproducidas de (12,40) ®

Asimismo, el conjunto de la UNV muestra una elevada actividad metabólica en sí misma. Cualquier compuesto externo que logre traspasar los distintos componentes celulares de la BHE, se enfrenta a una elevada actividad enzimática que tienen como objetivo la descomposición química o expulsión de sustancias extrañas (11,41). Este paso corresponde a un obstáculo más para el ingreso de sustancias potencialmente dañinas complementando el papel protector de la BHE en la homeostasis cerebral. La complejidad y eficacia de la BHE dependen de la interacción coordinada de todos sus componentes, cada uno desempeñando funciones cruciales para mantener la integridad y funcionalidad de esta barrera.

1.1.3.1 Células endoteliales

Las células endoteliales (CE) revisten las paredes de los vasos capilares que proveen de irrigación al cerebro, y constituyen el componente primario de la BHE (12,40). Las CE de los capilares cerebrales difieren en función y morfología de las CE de otros sistemas vasculares. En primer lugar, carecen de fenestraciones, lo cual resulta en una superficie de contacto reducida y, por lo tanto, limita la interacción con sustancias que podrían pasar a través del endotelio. En segundo lugar, tienen una carga superficial negativa que favorece la repulsión de sustancias polares. Este último fenómeno se caracteriza además por una polarización entre el lado luminal (circulación sanguínea) y el lado abluminal (orientado hacia el SNC) (42,43). Adicionalmente, el paso de sustancias se ve afectado porque las CE que forman parte de la BHE tienen una actividad pinocítica reducida (44,45).

Sin embargo, estas células poseen una tasa metabólica más alta que CE de otras interfases vasculares en el organismo, lo cual está relacionada con sistemas de transporte específicos, mediados por proteínas, que están involucrados en el ingreso selectivo de nutrientes y la expulsión de sustancias extrañas (11). Las CE de la BHE están íntimamente interconectadas, y los espacios intercelulares son ocluidos por la presencia de uniones estrechas y de proteínas de adhesión, restringiendo así el pasaje de sustancias en los espacios en medio de CE (42,43).

1.1.3.2 Uniones estrechas

Las uniones estrechas entre las células endoteliales son una característica clave para la reducida permeabilidad de la BHE (12). Los espacios intercelulares son bloqueados por un complejo grupo de proteínas que abarcan las proteínas transmembrana, proteínas de unión citoplasmática y proteínas del citoesqueleto (46). Entre las mismas se pueden citar proteínas como claudina, ocludina, cingulina, *zonula occludens*, entre otras proteínas de adhesión (*junctional adhesion molecules*) (47). Estos componentes forman extensivas filas de oclusiones que se solapan evitando así el paso de sustancias polares y macromoléculas hacia el SNC por la vía paracelular (a través de los espacios entre las CE) (48). Además, las uniones estrechas cumplen una función de barrera lateral sobre la membrana de las CE: los transportadores que deben estar presentes en la parte abluminal no pueden moverse a través de la membrana más allá de la unión estrecha, hacia la parte luminal. De esa manera las uniones estrechas también ayudan a mantener la polaridad de la membrana de las CE (49).

1.1.3.3 Pericitos

Los pericitos desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la BHE: contribuyendo significativamente a la formación de uniones estrechas, en procesos de angiogénesis y en procesos de remodelado vascular (22,40,47). Los pericitos se comunican con las CE mediante conexiones tipo “clavija” a través de una proteína llamada cadherina (25,50), y están involucrados en la expresión de transportadores específicos en las CE y en su polarización (25). Se ha observado que una pérdida en el número de pericitos correlaciona con una reducción de la función de barrera de la UNV (51).

Además, existe evidencia creciente que sugiere que poseen un papel significativo en los procesos patológicos asociados a diversas enfermedades neurodegenerativas y en procesos de neuroinflamación (52). La distribución de los pericitos a lo largo de los capilares cerebrales no es uniforme, y la cobertura de pericitos varía en función del grosor de la capa endotelial y el diámetro de los capilares mismos (50). Además, en conjunto con los astrocitos, regulan el flujo y la función vascular, modulando la respuesta inmunitaria y facilitando la eliminación de desechos (11).

1.1.3.4 Astrocitos

Los astrocitos son un tipo de células neuronales llamadas glía (o neuroglia) que cumplen funciones de protección del entorno neuronal, y en general de control de la homeostasis del SNC (8,17,53). Debido a su ubicación (ver figura 2-A), los astrocitos poseen una relación estrecha tanto con las sinapsis neuronales como con la vascularización cerebral (35). Poseen un papel fundamental en la dinámica de señalación del entorno cerebral, participando en la regulación de la homeostasis de los neurotransmisores, la eliminación de desechos, control del flujo sanguíneo, control del metabolismo de iones, y la coordinación de la respuesta neuroinmune (11,17).

Particularmente, los astrocitos regulan la formación y mantenimiento de la BHE (17) a través de la secreción de varios factores que afectan la expresión de proteínas de adherencia y otros factores de crecimiento endotelial (54). Se ha demostrado que estos factores son indispensables para que las CE muestren sus propiedades de permeabilidad típicas de la BHE (55,56). La creciente cantidad de evidencia científica sugiere que la degeneración o disfunción de los astrocitos es causa primaria o factor asociado en muchas de las enfermedades neurodegenerativas de mayor relevancia epidemiológica (53).

1.1.3.5 Membrana basal

La membrana basal (o lámina basal) es el componente acelular de la UNV. Corresponde a una red de proteínas extracelulares que, a su vez, provee de un anclaje para el resto de los componentes de la BHE (40,43). Además de brindar estabilidad mecánica, la membrana basal es esencial para la polarización de las CE y la regulación de la señalización intercelular (57). Adicionalmente, algunos autores han planteado que la membrana basal podría actuar como una barrera en sí misma, a través de un mecanismo de exclusión por tamaño molecular similar al que puede observarse en los glomérulos renales (58). Esta red está principalmente constituida por colágeno, laminina, fibronectina, entactina y varios proteoglicanos que son sintetizados y depositados por CE, pericitos y astrocitos (43,57). Esta composición, así como la integridad de la membrana basal, suele verse significativamente modificada durante procesos neuropatológicos, tanto crónicos como agudos (59,60).

1.1.3.6 Microglía

La microglía es otro subtipo de células de la glía que desempeñan funciones cruciales en la inmunidad neuronal al absorber partículas extrañas, participando en la reparación de tejidos dañados y en la señalización extracelular (57). Además, la actividad de la microglía es fundamental para regular la neuroinflamación (58), y se ha observado que su distribución a lo largo del parénquima cerebral es dependiente del contexto. Por ejemplo, la cantidad de microglía en áreas adyacentes a los capilares aumenta en respuesta a procesos inflamatorios o daño neuronal (61). También existe evidencia que apunta a que la expresión de proteínas de unión estrecha es regulada por la actividad de la microglía (57). Dada la diversidad de subtipos de microglía observados, y sus múltiples funciones dentro del ambiente cerebral -más allá de sus funciones dentro de la BHE- existe aún un amplio potencial para ampliar el entendimiento de las funciones de la microglía y otras células de la glía (43).

Después de analizar en detalle los diferentes componentes de la UNV, es importante destacar que las funcionales de barrera y su formidable selectividad es el fruto de la regulación y coordinación de una compleja red de mecanismos (57). La selectividad en cuanto al transporte de nutrientes junto con el bloqueo selectivo de sustancias externas es esencial para el funcionamiento correcto del cerebro (38). Comprender esta red de mecanismos es clave para poder descifrar las posibilidades de transporte que podrían explotarse para podrían eventualmente superar esta barrera.

1.1.4 Mecanismos de transporte habituales de la BHE

El cerebro concentra un alto porcentaje del consumo metabólico del organismo (62). Por lo tanto, existen varias rutas de transporte que le permiten proveerse de nutrientes y así mantener la homeostasis en ese entorno demandante (45,63). A través de la BHE, que en conjunto con sus funciones de barrera regula de forma dinámica y sostiene el suministro de nutrientes y eliminación de desechos, se proveen carbohidratos (principalmente glucosa), proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos mono carboxílicos, hormonas, ácidos grasos, nucleótidos, iones, aminos, colina, vitaminas, y células del sistema inmune, entre otros elementos requeridos para el correcto funcionamiento del cerebro y su coordinación con el resto del organismo (43,50,64–67).

Este suministro esencial se realiza a través de mecanismos de transporte clasificados en dos grandes categorías: difusión paracelular y transporte transcelular (63). El transporte transcelular, a su vez, incluye las vías de: transcitosis transcelular, transcitosis mediada por

proteínas transportadoras, transcitosis mediada por receptores, transcitosis mediada por adsorción y transcitosis mediada por células (45,63). La Figura 3 ofrece una ilustración de estos mecanismos ejemplificados en el contexto de la UNV. Cabe destacar que en la comunidad científica es ampliamente aceptado que existen otros sistemas de transporte endocítico por ser descubiertos y descritos con mayor detalle (68).

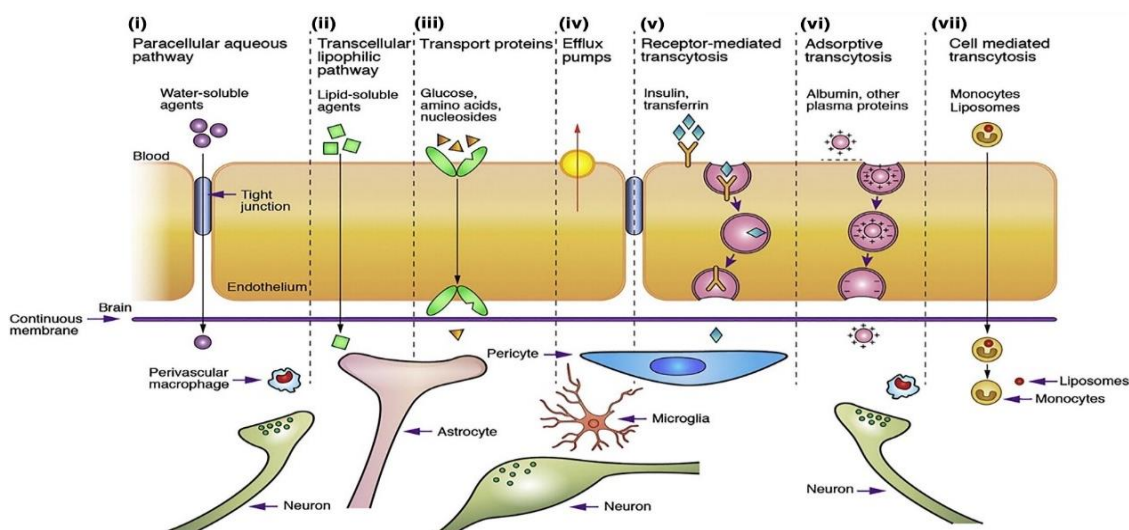


Figura 3: Mecanismos de transporte presentes en la BHE.

(i) La vía de transporte paracelular conlleva el paso de sustancias solubles en agua a través de las uniones estrechas entre células endoteliales (CE). (ii) La vía de la transcitosis transcelular corresponde a la difusión de sustancias lipófilas a través de las CE. (iii) Proteínas de transporte facilitan el paso debido a cambios conformacionales fruto de la unión de sustancias específicas como glucosa, aminoácidos y nucleósidos. (iv) Bombas de eflujo se encargan de la expulsión activa de sustancias exógenas y metabolitos hacia la circulación sistémica. (v) En la transcitosis mediada por receptores el mecanismo de transporte se basa en la endocitosis desencadenada por la unión de ligandos a sus receptores específicos. (vi) La transcitosis mediada por adsorción ocurre fruto de las interacciones electrostáticas entre sustancias cargadas positivamente y la superficie de las CE. (vii) La transcitosis mediada por células es un mecanismo de transporte dependiente del paso de células del sistema inmune a través de la BHE. Imagen reproducida de (63)*.

1.1.4.1 Difusión paracelular

La difusión paracelular (Figura 3-i) corresponde al paso de sustancias en el espacio entre dos células endoteliales adyacentes (69). Corresponde a un tipo de transporte inespecífico impulsado por el gradiente de concentración desde la circulación sanguínea hacia el cerebro, y está limitado a moléculas solubles en agua, no ionizadas y que tengan pesos moleculares menores a 500 Daltons, entre otras restricciones (45). Las proteínas que corresponden a las uniones estrechas son responsables de regular el transporte paracelular (43), y se ha observado que cambios en la composición estructural de las mismas puede ampliar el rango de peso molecular de las sustancias que pueden cruzar la barrera mediante este tipo de transporte (70).

1.1.4.2 Transcitosis transcelular

La transcitosis transcelular (o difusión transcelular, Figura 3-ii) es el paso de sustancias de bajo peso molecular, liposolubles, relativamente hidrofílicas y no ionizadas a través de las CE de la BHE (45). El alcohol y algunas hormonas esteroidales traspasan la BHE a través de este mecanismo debido a que se disuelven en la membrana plasmática de las CE (63). Al igual que en la ruta paracelular, este mecanismo corresponde a un tipo de transporte inespecífico e impulsado por un gradiente de concentración (45).

1.1.4.3 Transcitosis mediada por proteínas transportadoras

Algunas proteínas de transporte, como la isoforma GLUT-1 para el transporte de glucosa o las proteínas LAT para el transporte de aminoácidos grandes (del inglés *large-aminoacid transporter*), están involucradas en el transporte de ligandos específicos (45). Como se ilustra en la Figura 3-iii, el transporte mediado por proteínas (en inglés: *carrier-mediated transport*) se produce cuando el compuesto específico se une a su proteína transportadora del lado luminal de la barrera (en contacto con la circulación sistémica), provocando un cambio conformacional de la proteína que la lleva hacia el lado abluminal donde se da la liberación del compuesto al otro lado de la membrana endotelial, dentro del SNC (63). Además del transporte de glucosa y aminoácidos, este tipo de transporte está también asociado al transporte de algunas vitaminas, iones orgánicos, hormonas, nucleósidos y ácidos grasos, entre otros (43). Esta vía corresponde a un tipo de transporte específico que, en caso de ser necesario, puede involucrar el consumo de energía (provista por adenosin trifosfato, ATP) para facilitar el movimiento de los compuestos aún en contra de un gradiente de concentración (63).

1.1.4.4 Transcitosis mediada por receptores

El transporte de macromoléculas endógenas a través de la BHE se realiza a través de transcitosis mediada por receptores (en inglés, *receptor-mediated transcytosis*)(69). A diferencia de los cambios conformacionales que constituyen el mecanismo de transporte mediado por proteínas, cuando un ligando se une a su receptor de transporte específico provoca una invaginación de la membrana de la CE que forman unas vesículas que son transportadas hacia el citoplasma llamadas endosomas (Figura 3-v). El ligando se disocia del receptor tras la acidificación del endosoma, y es exocitado hacia el lado abluminal de la barrera (45,63). Algunas de las sustancias endógenas transportadas mediante este transporte activo de transcitosis mediada por receptores son la insulina, transferrina, leptina, vasopresina y diversas lipoproteínas (43,71). La formación de los endosomas es facilitada por redes especializadas, creadas principalmente por las proteínas clatrina y caveolina, que permiten la invaginación de la membrana plasmática (68,72).

1.1.4.5 Transcitosis mediada por adsorción

La transcitosis mediada por adsorción, también llamada vía de la pinocitosis, es una vía de transporte no específica desencadenada por la interacción electrostática de una sustancia cargada positivamente y la superficie negativamente cargada de algunos de los dominios de la membrana celular de las CE (68,73). Esta vía de transporte tiene una menor afinidad para con su ligando, pero una mayor capacidad que la observada, por ejemplo, con la transcitosis mediada por receptores (63). La transcitosis mediada por adsorción es una vía implicada en el transporte de algunas macromoléculas plasmáticas como la albúmina o proteoglicanos derivados de la heparina (63,73).

1.1.4.6 Transcitosis mediada por células

La transcitosis mediada por células es la última de las vías de transporte conocidas en haber sido descrita (63). Este tipo de transporte se basa en la capacidad que tienen células del sistema inmune (tales como: neutrófilos, monocitos y macrófagos) para cruzar la BHE tanto en condiciones sanas como patológicas (45). Se ha descrito esta ruta de transporte como la vía de entrada de algunos patógenos hacia el SNC como virus, hongos o bacterias (74,75) lo que ha llevado a llamarla también la vía del “caballo de troya” (63).

1.1.4.7 Bombas de eflujo

Por último, existe una vía de transporte relacionada no con el paso de sustancias hacia el cerebro, sino con su expulsión de vuelta a la circulación sanguínea. Se trata de la presencia de bombas de eflujo que de forma activa (dependiente de ATP) se encargan de la eliminación de sustancias exógenas y que constituyen una limitación para la acumulación de compuestos que logren atravesar la BHE en alguna medida (45). Estos sistemas de transporte también están relacionados con la excreción de metabolitos y sustancias endógenas hacia el torrente sanguíneo (43). Los principales transportadores de eflujo identificados son el transportador glicoproteína P (P-gp) acoplado a ATP y la proteína de resistencia a múltiples fármacos (63).

El conjunto de la serie de mecanismos descritos, en combinación con el entendimiento de las consideraciones estructurales (sección 1.1.3), permite comprender la excepcional función de la BHE en términos del mantenimiento de la homeostasis cerebral y su impacto en términos del transporte de sustancias exógenas (45)., y reconocer de esa forma las limitaciones significativas que estas características presentan para el desarrollo de tratamientos efectivos contra las enfermedades del SNC.

1.1.5 Impacto de la BHE en el desarrollo terapéutico para enfermedades del SNC

A pesar de los numerosos avances de las ciencias biomédicas, la disponibilidad de medicamentos para tratar enfermedades del SNC es limitada debido a la dificultad para que los fármacos atraviesen la BHE o se acumulen en concentraciones suficientes para ejercer un efecto terapéutico (60,76). O bien existe una imposibilidad a la acumulación en tejido cerebral, o solo podrían alcanzarse dosis terapéuticas administrando dosis muy elevadas que podrían provocar efectos tóxicos a nivel sistémico (77–79).

Se estima que la BHE provoca la exclusión del 98% de los medicamentos de bajo peso molecular (en inglés *small molecule medicines*) y prácticamente la totalidad de los medicamentos que corresponden a biomoléculas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, anticuerpos, y vectores virales (43).

Las enfermedades del SNC, que incluyen trastornos neurodegenerativos, lesiones cerebrales, procesos neoplásicos, y desórdenes neuropsiquiátricos, representan a una carga económica creciente para los sistemas de salud (80,81). Actualmente estos padecimientos representan cerca de un 6,3% de la carga global asociada a todas las enfermedades (38). Además, el aumento en la expectativa de vida y el consecuente envejecimiento de las poblaciones plantean una perspectiva en la que se espera que el impacto epidemiológico de las enfermedades neurodegenerativas, con una edad típica de aparición entre los 50 y 70 años. Por lo tanto, se prevé que la presión sobre los sistemas de salud continúe en aumento lo que subraya la importancia de buscar estrategias terapéuticas para estos trastornos (82–84).

Muchas de las grandes compañías farmacéuticas destinan recursos limitados para el desarrollo de medicamentos para el SNC, principalmente por el elevado coste de desarrollo, la larga duración y la baja tasa de éxito en cuanto a traslación clínica asociada a este tipo de desarrollos (80,85,86). Es importante señalar que el desarrollo de medicamentos para tratar enfermedades del SNC también enfrenta otros desafíos tales como un limitado conocimiento de las fisiopatologías asociadas a muchas enfermedades a tratar, así como la dificultad para establecer los puntos finales o criterios de evaluaciones efectivos durante los estudios clínicos, además de las dificultades planteadas por la presencia de la BHE (85).

El desarrollo de nuevas herramientas para sobrepasar los desafíos que representa la administración hacia el cerebro permitirá aumentar las opciones terapéuticas disponibles para enfrentar las enfermedades del SNC (80). Reconocer el formidable reto que representa la administración de medicamentos a través de la BHE recalca la importancia de continuar explorando y entendiendo esta barrera no solo como un obstáculo, sino también como una oportunidad para aprovechar el potencial de sus mecanismos habituales de transporte en el desarrollo de sistemas innovadores para la administración de medicamentos.

1.1.6 BHE Estrategias para la administración de medicamentos a través de la BHE

El desarrollo de estrategias terapéuticas que faciliten la administración de medicamentos a través de la BHE constituye un área de gran interés para la comunidad académica (38,87,88), que se ha visto beneficiada del rápido progreso en biología molecular y del mejor entendimiento de los mecanismos de barrera, así como de las enfermedades del SNC (63).

Una de las estrategias de desarrollo terapéutico para el SNC es el enfoque en la síntesis o modificación de *small molecules* para que cumplan con algunas características que les puedan permitir atravesar la BHE directamente (43,86,89). La búsqueda basada en la implementación de la regla de Lipinski o sus modificaciones (90–92) ha sido ampliamente utilizada como punto de referencia para predecir la posible permeabilidad de un compuesto a través de la BHE (93,94), partiendo de algunos atributos estructurales predictores como lo son poseer: i) un peso molecular inferior a 450 Da, ii) un coeficiente de partición (Log P) entre 2 y 4, iii) baja capacidad de donador de enlaces de hidrógeno (menos de 10 átomos por molécula), y iv) un valor de pKa entre 6 y 10,5 (fundamentalmente, que no esté ionizado a pH fisiológico). Estas características pueden facilitar su transporte principalmente a través de transcitosis transcelular (63,93).

Sin embargo, se ha demostrado que más de una tercera parte de los compuestos que atraviesan la BHE no cumplen con la regla de Lipinski, y que los valores de Log P de los compuestos que atraviesan la barrera no difieren significativamente de aquellos que no lo hacen (95). Por lo tanto, esta estrategia puede resultar inespecífica e impredecible. Además, hay que considerar que no todos los compuestos potencialmente terapéuticos pueden ser modificados para cumplir con estos requisitos (63,89).

Como consecuencia, diversas estrategias han emergido como parte de los esfuerzos para aumentar el transporte de medicamentos a través de la BHE (76,81,86–88,93,96). Las estrategias físicas, químicas o biológicas que son explotadas para el transporte de sustancias a través de la BHE pueden categorizarse en: i) métodos invasivos y ii) métodos no invasivos, según la clasificación mostrada en la Figura 4.

1.1.6.1 Métodos invasivos

Para sobrepasar el impedimento de acumulación de fármacos en el SNC tras la administración sistémica, algunos medicamentos pueden ser administrados directamente en el tejido cerebral tras la perforación o disrupción (física, o bioquímica) de la BHE, o implantando sistemas de liberación biodegradables de liberación sostenida (87). Esta ruta suele ser viable durante intervenciones quirúrgicas tras la extirpación de tumores malignos, para tratar hemorragias subaracnoideas o tras lesiones traumáticas (80).

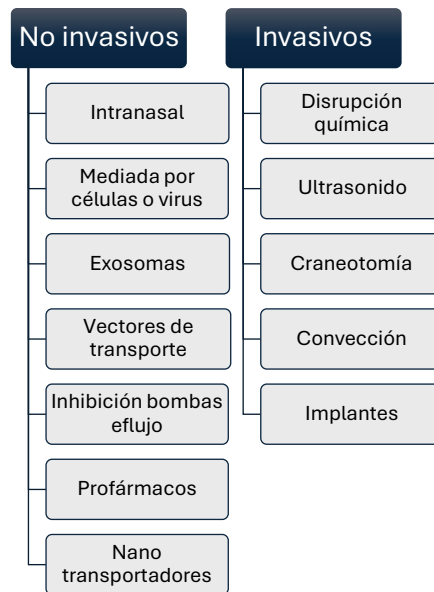


Figura 4: Clasificación de los métodos aplicados para transportar medicamentos a través de la BHE.

Se muestran algunos de las estrategias más comúnmente utilizadas para administrar medicamentos al SNC según correspondan a métodos no invasivos o métodos invasivos. Imagen modificada de (87,88)

1.1.6.1.1 Disrupción de la BHE

Son métodos donde se provoca una apertura temporal de la BHE debido a la disminución de la integridad de las CE o de las uniones estrechas. Esto puede ser realizado a través de la administración de sustancias químicas o por la acción de medios físicos. La disrupción química puede darse por la aplicación de sustancias como manitol, etanol o soluciones hiperosmóticas -por ejemplo, de dextrosa- o incluso la administración de toxinas, mientras que los métodos físicos incluyen radiación, microondas, estimulación termomagnética o ultrasonido (63,87,89,93).

La apertura osmótica es una estrategia con amplia aplicación en la práctica clínica. Posee la desventaja de que la apertura es no selectiva y que generalmente conlleva cierto grado de neurotoxicidad (43). La disrupción química acarrea inconvenientes significativos que no son agradables para el paciente, y puede comprometer la integridad y funcionamiento apropiado de la BHE, provocando potenciales efectos tóxicos en el SNC de otras sustancias -más allá del medicamento objetivo- que deberían ser retenidas por la barrera (89).

La aplicación de ultrasonido puede suprimir la expresión de proteínas de las uniones estrechas abriendo la BHE de forma temporal sin daño al tejido cerebral y con un menor malestar comparado con la disrupción química. También se ha encontrado que puede aumentar la permeabilidad dentro de tumores cerebrales (89). Es un procedimiento transitorio, localizado y reproducible. Como desventaja, requiere de un equipo sofisticado y a la fecha aún se requieren más investigaciones sobre los mecanismos de apertura y las condiciones de monitoreo asociadas a la ejecución de la técnica (43). Algunos autores clasifican la apertura de la BHE por ultrasonido por una técnica no invasiva (97). Sin embargo, es una clasificación debatible por las implicaciones en la función integral de la barrera.

Existen algunas alternativas invasivas menos agresivas como la electroporación, en la que se realiza estimulación con pulsos eléctricos para inducir una desestabilización de las membranas que conlleva un aumento temporal de la permeabilidad que, en condiciones controladas, es reversible (98,99).

1.1.6.1.2 La administración intratecal y administración intracraneal

Este enfoque de administración se realiza directamente dentro del SNC por difusión a través del líquido cerebroespinal. En la administración intratecal se realiza una inyección en el canal espinal o en el espacio subaracnoideo (87), mientras que en la administración intracraneal la inyección se realiza directamente dentro de la cavidad del cráneo, ya sea en el espacio intracraneal, intracerebral o en el sistema ventricular (97,100).

Este sistema posee la ventaja de que la totalidad de la dosis administrada se encuentra disponible en el tejido cerebral tras su administración, evitando las consecuencias de una administración sistémica de altas cantidades de medicamento (89) necesarias para alcanzar concentraciones terapéuticas efectivas tras la administración por vías convencionales (60,76). Estas vías resultan desventajosas debido a que son altamente invasivas, por lo que pueden implicar una baja adherencia del paciente, sobre todo ante la necesidad de dosis repetidas (43). Sin embargo, este tipo de administración cobra relevancia en el caso de medicamentos potentes con potenciales efectos sistémicos nocivos, como los utilizados en la quimioterapia o agentes neurotrópicos (87,97).

1.1.6.1.3 Administración por convección

Cuando un medicamento es administrado directamente en el parénquima cerebral, su distribución a lo largo del tejido se da por una difusión debido al gradiente de concentración (97). Este proceso que puede verse limitado por el flujo relativamente bajo y la relativamente baja cantidad de líquido presente en el espacio extracelular cerebral (80). La administración por convección (o administración aumentada por convección) representa una forma de sobrepasar esta limitación mediante la aplicación de presión (100).

En este método se coloca un catéter dentro de un tumor cerebral y se mantiene un flujo por bombeo que genera un gradiente de presión positiva (86,93). Como desventajas presenta una distribución impredecible, con dificultades para poder monitorearla en vivo, y se requiere una optimización personalizada para diseño y colocación del catéter (43).

1.1.6.1.4 Implante de dispositivos

Otra técnica invasiva para la administración de medicamentos directamente al SNC puede realizarse a través de una intervención quirúrgica, en la que se coloca un dispositivo de un polímero biodegradable cargado con un medicamento (93). Este tipo de dispositivos permite una liberación sostenida de los medicamentos (43) y presentan un potencial para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, así como en el tratamiento de lesiones cerebrales (38). Los implantes comprenden geles, microesferas, nanoesferas u “obleas” (86). Tienen como desventaja que la distribución es baja, la dosis es limitada al tamaño del implante y que existen dudas sobre las consideraciones de seguridad a largo plazo (43).

1.1.6.2 Métodos no invasivos

Corresponden principalmente a la aplicación de estrategias farmacotécnicas que permiten llevar el medicamento hacia el SNC sin la agresividad y riesgos asociados a los métodos invasivos (89). Estos métodos incluyen la vía intranasal, la explotación de mecanismos endógenos de transporte de virus, de vesículas extracelulares o de células del sistema inmune, así como la modificación de moléculas con vectores de transporte o el uso de la nanotecnología (87,88). La síntesis o modificación de medicamentos mencionada al inicio de esta sección 1.1.6, incluyendo

las estrategias de formación de profármacos, se clasifican también dentro de estos métodos no invasivos (43,86).

1.1.6.2.1 Administración intranasal

La vía nasal es una ruta de administración de medicamentos que se puede utilizar tanto para la administración sistémica como para el acceso directo al cerebro (87). Por esta vía, los medicamentos pueden pasar al SNC a través de dos rutas distintas: los medicamentos lipofílicos y los biológicos de tamaño pequeño pueden permear el epitelio nasal y de allí pasar al cerebro y líquido cerebro espinal. La segunda ruta implica el transporte transneuronal a través de los axones del nervio trigémino y nervio olfatorio (80,89).

En los últimos años, la vía intranasal ha sido objeto de numerosos estudios y ha demostrado su eficacia para la administración de diferentes tipos de terapias a nivel preclínico. Actualmente, los esfuerzos se concentran en lograr la traslación clínica de utilizando esa vía de administración, con el objetivo de ser una alternativa para el abordaje de enfermedades del SNC (101–104).

Es una vía rápida y práctica que muestra una alta biodisponibilidad una vez absorbida. Sin embargo, existe el riesgo de degradación por enzimas de la mucosa nasal, por lo que es una ruta apropiada principalmente para fármacos con alta potencia (43).

1.1.6.2.2 Administración a través de vectores virales

Los virus neurotrópicos que cruzan la BHE naturalmente pueden ser explotados como estrategia de transporte de medicamentos hacia el cerebro (86). Para ello se puede emplear un vector viral que naturalmente traspase la BHE o modificando la superficie de otros vectores virales para incorporar un ligando natural que se acople a transportadores endógenos mediados por receptores (105,106). Ejemplos comunes de vectores virales utilizados con el fin de facilitar el paso a través de la BHE incluyen adenovirus, herpes o virus recombinante SV-40 y lentivirus, entre otros (43,89).

El mecanismo de entrada predominante en este tipo de administración es la transcitosis mediada por receptores (89), aunque el uso de vectores virales puede complementarse con la administración de un agente hiperosmótico (89) facilitando así el transporte por la vía transcelular.

Los vectores virales muestran una alta eficiencia y un tropismo celular específico, además de una relativa facilidad para la escalabilidad. Sin embargo, existen riesgos de una respuesta inmune adversa, además de riesgo de oncogénesis y mortalidad (43).

1.1.6.2.3 Administración mediada por células

La administración mediada por células, también conocida como la estrategia del caballo de Troya (ver sección 1.1.4.6), puede ser utilizada para la administración de sustancias hacia el SNC. Esta técnica aprovecha los mecanismos de transporte involucrados en la migración de ciertos tipos de células de la respuesta inmune como macrófagos, monocitos o neutrófilos, a través de la BHE (63,86,107).

Las propiedades fagocíticas de este tipo de células facilitan la internalización de agentes diagnósticos y terapéuticos, que posteriormente serán infiltrados hacia el cerebro durante la migración que ocurre en procesos inflamatorios (87). Una ventaja práctica de este tipo de transporte es que no requiere los tamaños a escala nanométrica necesarios para otras aplicaciones como la aplicación de nanotecnología (63). Sin embargo, esta técnica posee algunas

limitaciones, como la posible afectación de la viabilidad celular debido al compuesto a transportar y el riesgo de que la activación inmune provoque efectos adversos, como un aumento en el riesgo de trombosis (86).

1.1.6.2.4 Administración de exosomas

Las vesículas extracelulares (VE) o exosomas son partículas endógenas de entre 30 y 150 nanómetros que poseen la capacidad de sobrepasar barreras biológicas (43,89). Son pequeñas partículas formadas por trozos de membranas celulares que pueden empaquetar y transportar lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Teóricamente pueden ser producidas por todo tipo de células (108) y pueden ser utilizadas para transportar medicamentos ya sea en su forma natural o modificados (109). Se ha establecido que las VE poseen la capacidad de cruzar la BHE y que participan en la comunicación de tejido periférico con el SNC y en mantener la función neuronal normal (110).

Estos transportadores muestran una alta biocompatibilidad, a la vez que brindan una estabilidad para las sustancias encapsuladas. Sin embargo, hay una necesidad por el establecimiento de protocolos de aislamiento y purificación estandarizados (43).

Un porcentaje considerable de endosomas administrados de forma sistémica serán captados por el hígado, pulmón y bazo, así como diversas células fagocíticas del sistema inmune, circunstancia que puede ser atenuada mediante la modificación superficial de los exosomas con péptidos o proteínas (43,89).

1.1.6.2.5 Vectores de transporte

Corresponde al uso de proteínas o péptidos catiónicos para modificar de medicamentos y facilitar su paso a través de la BHE, aprovechando los mecanismos de transporte existentes (63,111). Estos vectores, conocidos en inglés como *shuttle proteins* o *shuttle peptides*; pueden ser aplicados a medicamentos de bajo peso molecular (112–114), medicamentos biológicos (115–117), o pueden ser combinados con otras estrategias de transporte como las nanopartículas (118–121). Esta técnica permite el paso de sustancias mediante transporte activo y pasivo (111,114,122).

1.1.6.2.6 Inhibición de las bombas de eflujo

Las bombas de eflujo, responsables de la excreción de sustancias exógenas y metabolitos (43) representan una limitación extra para la administración de medicamentos al SNC (86). Por ejemplo, aunque algunos medicamentos lipofílicos pueden cruzar la BHE en alguna medida, su acumulación se ve limitada por la acción de estas bombas de eflujo (63,93). De manera que la reducción de la actividad de las bombas de eflujo constituye una estrategia que puede aumentar la acumulación de sustancias terapéuticas en el cerebro (87,93).

1.1.6.2.7 Utilización de nanotecnología para administrar medicamentos a través de la BHE

La utilización de nanotecnología como estrategia para traspasar la BHE es una de las estrategias que más atención ha acumulado a lo largo de la última década, impulsada por un mejor entendimiento de los receptores involucrados en el transporte y los avances en química de polímeros y la nanotecnología misma (63,88,123–126).

Las nanoestructuras poseen características especiales que mejoran su potencial terapéutico para atravesar barreras fisiológicas, tales como su tamaño reducido, la posibilidad de modificación superficial, la especialización de materiales para su preparación y de las

propiedades superficiales de la nanoestructura misma, así como una alta capacidad relativa para transportar medicamentos y de controlar su liberación (36,63,93). Además, ofrecen el potencial de generar menos efectos adversos (38) y mejorar la biocompatibilidad, especialmente en el caso de algunos nanomateriales como las nanopartículas lipídicas, que favorecen un perfil de seguridad mejorado (125,126). Muchos de estos materiales presentan ventajas en cuanto a su viabilidad para la fabricación a escala industrial (127,128). Además de la entrega de fármacos, este tipo de estructuras tienen aplicaciones en diagnóstico e imagenología cerebral (89).

Dentro de los nanovehículos aplicados a la administración de medicamentos al SNC se incluyen nanoesferas, nanosuspensiones, nanoemulsiones, nanogeles, micelas, liposomas, nanofibras, nanotubos, nanorobots, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs, por sus siglas en inglés: *solid lipid nanoparticles*) y transportadores lipídicos nanoestructurados (NLCs, por sus siglas en inglés: *nanostucture lipid carriers*) (38). Las nanopartículas poliméricas y lipídicas (incluyendo liposomas) son los tipos de nanovehículos más utilizados para el transporte a través de la BHE (63). El desarrollo terapéutico y la aplicación detallada de las nanopartículas como vehículos para atravesar la BHE se explorarán más a fondo en la sección 1.2.10.

El desarrollo de estas estrategias terapéuticas amplía el horizonte de posibilidades para crear sistemas de liberación de fármacos capaces de superar el desafío que constituye la presencia de la BHE. La diversidad de estrategias potenciales no solo destaca la necesidad creciente de investigación para asegurar su seguridad y eficacia, sino que también destaca la importancia de contar con métodos apropiados para evaluar su efectividad en cruzar esta barrera fisiológica. Los métodos de evaluación se convierten así en una herramienta esencial para avanzar en la validación y optimización de estas estrategias dentro de un marco ético que respalde los numerosos avances científicos en este campo.

1.1.7 Métodos para evaluar la permeabilidad a través de la BHE

La disponibilidad de métodos representativos para evaluar o predecir la permeabilidad de un fármaco a través de la BHE es fundamental para optimizar los desarrollos terapéuticos destinados a tratar enfermedades del SNC (129,130). Estas herramientas son cruciales para reducir la tasa de fallos en etapas avanzadas del desarrollo de un medicamento, impactando directamente en los costos y disponibilidad (131) tanto de nuevos fármacos como en el reposicionamiento de moléculas existentes (130,132). Los diferentes modelos disponibles varían en complejidad, representatividad, facilidad de uso y aceptación general. La elección entre ellos depende de la disponibilidad, los recursos y los objetivos específicos de evaluación (133,134).

Aunque contar con evaluaciones de un organismo vivo es un entorno ideal para evaluaciones significativas, el uso de modelos *in vivo* en evaluaciones de medio a alto volumen puede resultar desafiante y costoso (89). Además, basar un programa de evaluación exclusivamente en modelos *in vivo* presenta dilemas éticos significativos (135,136). Esto resalta la importancia de los modelos *in silico*, *in vitro*, y las tecnologías emergentes como los organoides u “órganos en un chip” (OoC por sus siglas en inglés: *organ-on-a-chip*) para complementar y, en algunos casos, reemplazar estudios *in vivo* (137,138).

1.1.7.1 Modelos *in silico*

Los modelos computacionales ofrecen evaluaciones rápidas y económicas mediante correlaciones entre características físico-químicas y estructurales de los medicamentos (133). Actualmente, son principalmente aplicables para predecir la probabilidad de transporte pasivo

(139), ya que generalmente carecen de la capacidad de integrar completamente la complejidad biológica, molecular, mecánica y electroquímica del cerebro (130).

1.1.7.2 Modelos *in vitro*

Los modelos *in vitro* utilizados para evaluar el paso a través de la BHE se basan en cultivos celulares, que principalmente provienen de CE primarias o inmortalizadas. Estos cultivos pueden realizarse en monocultivo o en co-cultivos con otros componentes de la BHE (130,131,133,140). Además, los diferentes componentes de estos modelos pueden ser obtenidos a partir de células madre (141,142).

Los modelos *in vitro* son herramientas valiosas para estimar de manera realista la permeabilidad de un medicamento (131,134). Sin embargo, debido a la simplificación de la complejidad fisiológica de la BHE, estos modelos son más útiles para responder a preguntas científicas específicas (139) que para evaluar el éxito a largo plazo de medicamentos que requieran de dosificaciones continuas (131). Aunque reducen la complejidad a características clave de la barrera, permiten una configuración práctica y ahorran tiempo (133). Dada la heterogeneidad de la BHE, establecer un modelo que represente toda esta complejidad es un desafío, y la elección de un modelo particular dependerá de las necesidades específicas de cada investigación (133).

El método *in vitro* ideal debe ser dinámico, permitir la evaluación en tiempo real de la permeabilidad, facilitar la visualización y ser versátil, reproducible y económicamente asequible (133). Esencialmente, estos modelos deben incluir al menos la expresión de proteínas de unión estrecha y presentar una polarización de transportadores (133).

Aunque los modelos *in vitro* son útiles como método de cribado y pueden clasificar adecuadamente los compuestos según su permeabilidad a la BHE, a menudo presentan una correlación deficiente con la absorción cerebral *in vivo* debido a la regulación negativa de algunos transportadores específicos de la BHE (130,143). A la medida en la que un método *in vitro* se ajusta al comportamiento observado en pruebas *in vivo* se le denomina correlación *in vitro in vivo* (144,145).

1.1.7.3 Modelos *in vivo*

Los modelos animales para evaluar la permeabilidad a través de la BHE, al contar con una UNV completa y funcional, permiten una estimación más cercana al desempeño general de un medicamento y así una mejor traslación con el comportamiento clínico (133).

Los roedores son el modelo animal más utilizado para estudiar la BHE debido a su disponibilidad, fácil manipulación y por poseer un ciclo reproductivo relativamente corto. Además, su cerebro presenta similitudes moleculares, morfológicas y patológicas similares al del ser humano, lo que los hace particularmente representativos y relevantes para la investigación biomédica aplicada a humanos (133,144). Asimismo, mediante técnicas de ingeniería genética, es posible desarrollar animales transgénicos que manifiestan fenotipos específicos de ciertas patologías o que presentan una mayor similitud bioquímica con la fisiología humana, aumentando así su aplicabilidad para estudios más avanzados (146–149).

Después de los roedores, el pez cebra ha sido ampliamente utilizado como modelo debido a que su cerebro está protegido por una barrera que muestra una alta similitud morfológica y bioquímica con ciertas propiedades de la BHE de los mamíferos (150–152). Los modelos de primates no humanos, como los macacos Rhesus, o los modelos caninos, también son opciones

disponibles, pero su uso no es tan frecuente debido al tamaño del animal, que dificulta su manejo, como por los altos costos y las consideraciones éticas involucradas (133,153).

El control y monitorización de los estudios en animales puede verse limitado por las restricciones físicas, económicas y éticas asociadas con la operación de un animalario (133). La manipulación de los animales y los resultados de los estudios pueden ser influidos por patrones de comportamiento específicos o por estímulos ambientales. Además, la consistencia de los datos recolectados puede verse comprometida por la variabilidad genética entre los sujetos (154–156). Algunos experimentos requieren largos períodos de observación, mientras que la observación y cuantificación de resultados puede no ser tan inmediata como lo es en los estudios *in vitro*, lo que puede incrementar los tiempos y costos de una investigación (130,157). Los estudios de tejido *ex vivo* se presentan como una alternativa cuando el manejo del animal completo no es práctico o cuando se desea evitar el efecto del metabolismo sistémico (133).

Sin embargo, los fármacos desarrollados y probados en modelos animales suelen presentar perfiles de eficacia y toxicidad diferentes cuando se prueban en humanos (158,159). Las dificultades de la traslación de la fase preclínica a la clínica dependen, entre otros motivos, de las variaciones de las características de la BHE en las distintas especies (160–163). Por ejemplo, los cerebros humanos presentan una mayor proporción y complejidad de astrocitos neocorticales en comparación con los roedores (15), al tiempo que muestran una menor expresión de claudina-5, una proteína relevante para la funcionalidad de las uniones estrechas (163). Además, se ha demostrado que las diferencias en las secuencias, la expresión y la morfología de los sistemas transportadores nativos afectan al transporte y la distribución de sustancias en el cerebro (152,162,164). Por ejemplo, la expresión de la glicoproteína P es menor en la BHE humana que en la de los roedores (160,161). Esta limitación de los modelos preclínicos subraya la necesidad de enfoques innovadores que imiten con mayor exactitud la fisiología de la BHE humana y predigan mejor los resultados clínicos.

1.1.7.4 Sistemas de “órgano en un chip”

Los modelos emergentes de evaluación basados en co-cultivos celulares y microfluídica conocidos como organoides, organoides en un chip, órgano en un chip (*organ-on-a-chip*, OoC)¹, sistemas microfisiológicos o cultivos 3D, están diseñados para simular no solo la composición histológica de órganos y tejidos, sino también para reproducir su arquitectura tridimensional y los estímulos de flujo (137,138,165). Estos sistemas ofrecen la ventaja de una diferenciación celular más similar al entorno *in vivo* y una respuesta más precisa a las funciones fisiológicas, lo que los convierte en una alternativa de investigación de fácil manejo y alta representatividad, combinando algunas de las principales ventajas de los métodos de evaluación *in vitro* y los métodos *in vivo* (165–167).

Es un área de creciente interés que se ha beneficiado por el desarrollo de disciplinas como la microfluídica, la ingeniería de cultivos, la ingeniería de materiales y la ingeniería de microsistemas. Estas disciplinas permiten la creación de microambientes que replican con precisión condiciones mecánicas y estructurales de sistemas endógenos, logrando una alta

¹ Paralelo al proyecto desarrollado en esta tesis doctoral se publicó una revisión bibliográfica sobre los sistemas *Organ-on-a-chip* que abarca su definición, constitución y aplicaciones generales. Dicha publicación corresponde a la referencia (165).

similitud con condiciones fisiológicas (134,165). Los sistemas OoC permiten incluso modelar condiciones específicas y representar la variabilidad inter-individuos (165).

Su aplicación para la investigación asociada a la BHE y la administración de medicamentos hacia el SNC es una evolución de los cultivos tradicionales en pocillos *transwell* (168). Las propiedades de barrera de algunos sistemas OoC han mostrado resultados comparables con los resultados *in vivo* (168). Además, muestran una ventaja adicional como es la facilidad de acople para la realización de evaluación de medicamentos de alto volumen, conocido en inglés como *high throughput screening* (169,170). Sin embargo, la mayoría de los sistemas OoC para evaluar paso a través de la BHE se encuentran en fases muy tempranas de desarrollo o están disponibles únicamente para laboratorios con experiencia significativa en bioingeniería (131). Independientemente del tipo de modelo que se emplee, es crucial realizar una validación adecuada para asegurar su representatividad en la clínica humana (130). Adicionalmente, la selección del método debe estar alineada con los objetivos específicos de cada investigación (133). La Figura 5 proporciona un esquema de decisión que puede guiar el proceso de selección de un modelo apropiado en función de los objetivos específicos de investigación.

El poder modelar la función de la barrera en diferentes enfoques es una demostración del grado de desarrollo científico alrededor del concepto general de la BHE: sus orígenes evolutivos, su composición, su impacto en el desarrollo terapéutico, sus mecanismos de transporte y las estrategias biomédicas para explotarlos. Este significativo esfuerzo multidisciplinar demuestra el grado de entendimiento que la comunidad científica ha alcanzado sobre el fenómeno de la BHE. Este cuerpo de conocimiento es significativo por sí mismo, pero también sirve como un pilar fundamental para las investigaciones en el campo de la neurociencia. Descifrar los mecanismos que limitan la entrada al SNC abre la puerta a un nuevo horizonte terapéutico que podría revolucionar la neuromedicina en los próximos años. En este contexto, la nanotecnología emerge como una posible solución revolucionaria, ofreciendo sistemas de transporte avanzados con el potencial de abrir las puertas de la BHE (63,88,124). La siguiente sección profundizará en el entendimiento de estos sistemas, explorando sus aplicaciones como sistema de transporte y los desafíos principales para acceder al SNC de manera eficaz y trasladable a la práctica clínica.

	Target Read-out	Key Requirements	Suitable Model(s)
Target Discovery	Brain pathophysiology	Disease representation Different cell types Transporters & receptors	■■■ <i>In vivo disease models</i> ■■□ <i>Primary cultures</i>
	Therapeutic efficacy	Monitoring therapeutic outcomes	
Drug Screening	Target affinity (QSAR)	Permeability-physiochemical properties correlation	■■■ <i>In silico models</i>
	Transporter kinetics	High-sensitivity	■■■ <i>Microfluidic models</i>
	Cellular toxicity	Transporters & receptors	■■□ <i>Stem cell cultures</i> ■□□ <i>Endothelial cell cultures</i>
	Pharmacological efficacy Dose-response assessment Pharmacokinetics In vivo toxicity	Disease representation Transporters & receptors Monitoring therapeutic outcomes Compartmental drug monitoring	■■■ <i>In vivo disease models</i> <i>PET-imaging, Microdialysis, IV, CSF, organ collection</i> ■■□ <i>In situ perfusion</i>
DDS Development	Cellular uptake & trafficking Cellular toxicity	Transporters & receptors Limited paracellular diffusion	■■■ <i>Cocultures</i> ■■□ <i>Primary cultures</i> ■□□ <i>Endothelial cultures</i>
	Abluminal transport Pharmaco-proteomics	Differentiation based on: - Molecular weight - Lipophilicity	■■■ <i>Isolated microvessels</i>
	Luminal transport Flow-dependent transport	Transporters & receptors Limited peripheral metabolism Dynamic shear stress	■■■ <i>In situ perfusion</i> ■■□ <i>Microfluidic cultures</i> ■■□ <i>Isolated microvessels</i> ■□□ <i>Dynamic cocultures</i>
	Flow-independent transport Cerebral metabolism	Transporters & receptors No peripheral interference	■■■ <i>Ex vivo models</i>
	Pharmacodynamics Dose-response assessment Pharmacokinetics Organ distribution In vivo toxicity	Disease representation Transporters & receptors Real-time monitoring Monitoring therapeutic outcomes Compartmental drug monitoring	■■■ <i>In vivo disease models</i> <i>Imaging, Microdialysis, IV, CSF, organ collection</i> ■■□ <i>In situ perfusion</i> ■□□ <i>Microfluidic models</i>

Figura 5: Esquema de selección para el tipo de modelo para evaluar la permeabilidad a través de la BHE. Se destaca la aplicabilidad de distintos tipos de modelos según los objetivos de evaluación que puede surgir en cada fase del desarrollo de un medicamento. Las etapas se dividen en: descubrimiento de dianas, cribado de fármacos y desarrollo de la forma farmacéutica. Dependiendo del requerimiento específico, como por ejemplo el estudio de la fisiopatología cerebral, evaluación de afinidad o de la eficacia farmacológica, se especifican los modelos más adecuados, desde *in vitro* hasta *in vivo*, pasando por modelos *in silico* y microfluidicos. Esta clasificación permite ejemplificar el razonamiento que debe generarse detrás de la selección de un método y su aplicabilidad según el objetivo específico del desarrollo farmacológico. Imagen reproducida de (133).

1.2 Nanotecnología en el desarrollo de sistemas terapéuticos avanzados

1.2.1 Breve historia de la nanotecnología

La nanotecnología es un campo multidisciplinario que engloba la preparación, manipulación y medición de estructuras, dispositivos y microambientes a escala nanométrica (171,172). Generalmente, se considera que un material puede clasificarse como nanomaterial si al menos una de sus dimensiones es menor a 100 nm (171,173–175). Sin embargo, dependiendo del área específica de la nanotecnología, algunos autores extienden esta clasificación para estructuras de hasta 300 nm (176–179).

En el mundo actual, las aplicaciones de la nanotecnología están presentes y se extienden a través de sectores dispares incluyendo la agricultura (180), la explotación de combustibles fósil (181), el aprovechamiento de energías renovables (182,183), la fabricación de textiles (184), el tratamiento de desechos (185,186), la industria alimenticia (187), la preparación de materiales de construcción (188), y la farmacia y biomedicina (189,190), entre otras. Sin embargo, tanto la humanidad como la naturaleza han aprovechado, directa o indirectamente, las propiedades de los nanomateriales durante miles de años.

Hallazgos arqueológicos alrededor del mundo revelan que el uso de nanomateriales por los seres humanos se remonta al menos 4500 años atrás (174,191). Una de las evidencias más claras de esta temprana explotación se manifiesta en el aprovechamiento de las propiedades ópticas de partículas nanométricas presentes en ciertos materiales, evidentes en piezas decorativas provenientes de diferentes culturas como la romana, maya, egipcia y la antigua China, pasando también por el arte medieval (174,192). Asimismo, se ha observado que antiguas técnicas de fabricación de bloques de construcción y armas mostraban mejoras considerables en sus propiedades mecánicas, atribuibles al uso de técnicas que inducían la formación de partículas y estructuras nanométricas, y que hoy en día se pueden identificar y comprender a la luz del conocimiento en la materia (172,193). Más allá de la intervención del ser humano, existen numerosos ejemplos en animales, plantas y minerales que demuestran cómo la naturaleza misma genera y aprovecha fenómenos y propiedades que pueden ser entendidas a través del campo de la nanotecnología (193–198).

Muchos autores coinciden que el origen de la nanotecnología moderna se encuentra en la reunión anual de la Sociedad Americana de Física de 1959, donde el ganador del Premio Nobel en Física en 1965, Richard Feynman, impartió una charla titulada: *“There's Plenty of Room at the Bottom”* (“Hay mucho espacio en el fondo”) (172–174,199–202). Como idea central de esta influyente charla, Feynman propuso que las leyes de la naturaleza no son las que limitan nuestra capacidad para manipular compuestos y trabajar a escala atómica o molecular, sino que las limitaciones están en la falta de equipos y técnicas apropiadas para trabajar a ese nivel (174). Efectivamente, en las últimas 6 décadas el campo de la nanotecnología ha experimentado una notable expansión como disciplina, impulsada significativamente por el avance en las técnicas y equipos que permiten la observación y la manipulación precisa a escala nanométrica (173,193).

Dentro de esta evolución tecnológica, algunas de las técnicas analíticas empleadas para la caracterización de nanomateriales incluyen la microscopía de transmisión de electrones, microscopía electrónica de barrido, microscopía de fuerza atómica, dispersión dinámica de la luz, espectroscopía de rayos X, difracción de rayos X, y espectroscopía de masas de plasma acoplado inductivamente. Otras técnicas emergentes son la espectroscopía de electrones

Auger, espectroscopia de estructura fina de absorción de rayos X y la dispersión Raman mejorada en superficie, entre otras (203–205).

El desarrollo tecnológico ha mejorado la habilidad para manipular y estudiar la materia a escala nanométrica, y por lo tanto ha propiciado el descubrimiento y creación de una diversa gama de nanomateriales. Este avance ha abierto un amplio espectro de posibilidades y aplicaciones, impactando significativamente en diversos campos del saber a lo largo de las últimas décadas. Particularmente, la Figura 6 ilustra algunos de los hitos más relevantes de la nanotecnología como disciplina.

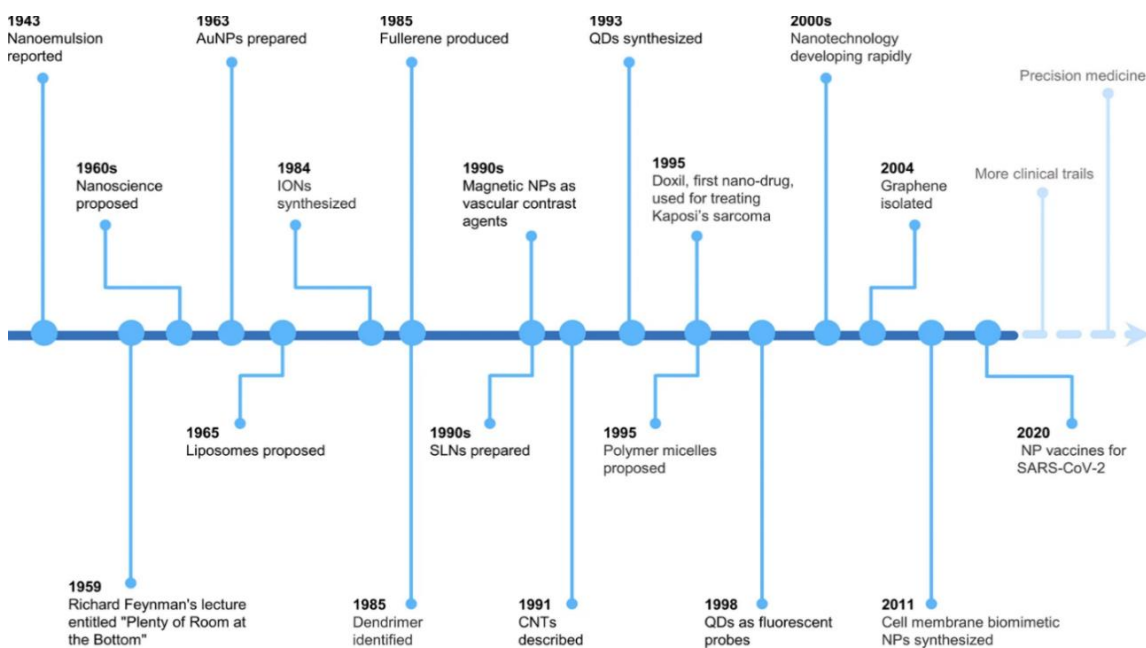


Figura 6: Hitos en la historia moderna de la nanotecnología

Se destacan algunos hitos importantes partiendo desde la primera nanoemulsión reportada en la década de 1940 hasta la actualidad. Luego de la conceptualización de la nanotecnología en la década de 1960, se empezó a reportar la síntesis de diversos tipos de nanomateriales que significaron de avances significativos en el campo, asimismo como el desarrollo de diversas aplicaciones biomédicas como la generación de agentes de contraste, la aplicación de agentes quimioterapéuticos como nanoconstructos y, más recientemente, la aplicación de las nanopartículas como vehículos para la aplicación de vacunas para combatir el SARS-CoV-2. Imagen reproducida de (173)[®].

Particularmente en el campo de la biomedicina, la nanotecnología ha surgido como una herramienta para preparar sistemas de liberación novedosos. Desde las primeras aplicaciones en la preparación de liposomas en la década de 1960 hasta las modernas aplicaciones para vehicular ácidos nucleicos, la nanotecnología no solo ha demostrado su potencial como sistema de liberación de fármacos (sección 1.2.2) y herramienta diagnóstica, sino que ha dado el salto a la clínica.

Un hito significativo, destacado en varias publicaciones como un punto de inflexión en la historia de la nanomedicina, es la aprobación del Doxil[®] para uso clínico por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en el año de 1998 (172,173). Este medicamento fue originalmente aprobado para el tratamiento de sarcoma de Kaposi. Gracias a la modificación de las propiedades farmacocinéticas debido a la encapsulación del principio activo (doxorubicina) en liposomas, esta formulación ofrece un perfil de seguridad y eficacia mejorado en comparación con la administración de doxorubicina libre (206,207). Más recientemente, la aprobación de medicamentos para el silenciamiento (208,209) y edición génica (210,211), junto con las vacunas mRNA para el COVID-19 (212) y numerosas aplicaciones diagnósticas demuestran el grado de impacto de la nanotecnología en la medicina moderna.

1.2.2 Aplicaciones de la nanotecnología como sistemas de liberación de fármacos

En los últimos 40 años, los avances en la medicina impulsados por la nanotecnología se encuentran entre los avances que han reunido mayor interés, dentro de los diversos campos impactados por esta disciplina (213). La nanotecnología ha demostrado un potencial significativo en áreas como la vehiculización de fármacos, los biosensores, la ingeniería de tejidos, la nanobiotecnología y el desarrollo de herramientas diagnósticas (214,215). Especialmente, su aplicación en el transporte y liberación de fármacos ha sido crucial para enfrentar desafíos claves en el desarrollo de medicamentos, incluyendo la superación de barreras biológicas, mejora de la biodisponibilidad, reducción de toxicidad, el direccionamiento activo de tratamientos, e incluso la adaptación a la heterogeneidad entre pacientes (213–215).

La nanotecnología ha mostrado potencial para sobrepasar esos desafíos gracias a su capacidad para combinar terapias, evitar mecanismos de resistencia o su capacidad de modificación y personalización (216). Permite diseñar sistemas nanoestructurados para mejorar la estabilidad de los fármacos y prolongan su tiempo de circulación en el organismo (217,218). Además, la formulación de medicamentos en este tipo de sistemas permite un control sobre la dosificación, la acumulación y, en algunos casos, sobre el sitio de liberación de los fármacos (213,214,217,219). De manera más especializada, la incorporación de bioestructuras en los nanomateriales habilita un potencial para el direccionamiento activo hacia células o tejidos diana específicos (220–222). El impacto de la nanotecnología en las aplicaciones biomédicas radica en partes porque sus características funcionales entran en armonía con los procesos biológicos que ocurren a escala nanométrica (223).

No obstante, la implementación de la nanomedicina enfrenta también retos significativos (224) como lo son el riesgo y la necesidad de controlar la inducción de respuestas inmunes (214,215), así como el riesgo de contaminación ambiental por la dispersión de nanopartículas en el medio ambiente (225,226). La eficacia de los nanomateriales está estrechamente ligada a sus propiedades fisicoquímicas (223), lo que resalta la importancia de contar con procesos de fabricación y caracterización que sean reproducibles (224). Además, el marco regulatorio para estas tecnologías aún está en desarrollo y no está armonizado entre las diferentes autoridades regulatorias (227,228), lo que añade un nivel adicional de complejidad al campo de estudio. Este escenario representa un reto que compromete el desarrollo del potencial de la nanomedicina (224,228).

A pesar de estos desafíos, las nanopartículas han demostrado su capacidad para vehiculizar una amplia gama de moléculas, desde *small molecules* hasta proteínas y ácidos nucleicos (229–232), así como sistemas combinados de fármacos y agentes diagnósticos (230,233,234). Esta versatilidad les ha permitido ser investigadas para diversas aplicaciones clínicas que demuestran que la nanotecnología es una herramienta prometedora en el desarrollo de la biomedicina. Los sistemas de liberación basados en nanomateriales han sido aplicados mayoritariamente en el desarrollo de terapias oncológicas (216), principalmente por su capacidad de minimizar efectos secundarios y facilitar su acumulación en tejidos tumorales (235,236). Sin embargo, su potencial no se limita al campo del cáncer, ya que también han sido ampliamente investigadas en otras áreas terapéuticas como, por ejemplo: enfermedades infecciosas (219,237,238), patologías cardiovasculares (239–242), trastornos metabólicos (243–246), trastornos neurológicos (247–251), e incluso para el abordaje de enfermedades raras (252–255), entre otras aplicaciones en fase de investigación.

Más allá de la abrumadora cantidad de literatura disponible en cuanto a la investigación para el desarrollo de la nanomedicina en el campo preclínico, numerosas investigaciones han avanzado a evaluaciones en etapas clínicas o están a punto de comenzarlas (227,247–249,256–259). En una búsqueda llevada a cabo en la base de datos *ClinicalTrials.gov* en octubre de 2024 se registran 690 estudios en los que se emplean nanopartículas, 109 con resultados y 347 activos, concentrados principalmente en estudios fase I y fase II (260). Además, estas investigaciones se complementan con alrededor de un centenar de formulaciones que a la fecha han alcanzado la aprobación regulatoria, confirmando de forma palpable la aplicabilidad de la nanotecnología en el campo (261,262).

1.2.3 Evolución del mercado farmacéutico de las nanopartículas

Numerosas publicaciones catalogan al Doxil® como “el primer nano-medicamento aprobado” (172,173,206,263,264) o a lo menos como la primera aprobación de un medicamento en forma de liposoma (265). Sin embargo, las primeras aprobaciones de medicamentos en los que se aplicaba la nanotecnología se remontan a las décadas de 1980, 1970 e incluso 1950, con la aprobación de varios medicamentos cuyas características y eficacia se basaban en su composición a partir de nanocristales (266–269). Además, la aplicación específica de medicamentos en formulaciones liposomales posee un antecedente con la aprobación de propofol lisosomal a finales de la década de 1980 (270–272). Esto evidencia que la irrupción de la nanotecnología en el mercado farmacéutico es anterior al hito de la aprobación del Doxil®, cuya notoriedad puede deberse a que, aunque no fue el primero, sí tuvo un impacto significativo no solo en el tratamiento específico del sarcoma de Kaposi, sino también en el abordaje de otros tipos de cáncer. Su impacto ayudó a consolidar el entendimiento del potencial de las nanopartículas para abordar desafíos en la vehiculización de fármacos y revolucionó el mercado en las décadas subsiguientes, impulsando la aplicación de la nanotecnología principalmente en el tratamiento del cáncer (266).

Otro hito importante en el campo de la nanotecnología farmacéutica es su aplicación en la vehiculización de ácido ribonucleico (RNA). En 2017 se otorgó la aprobación al Onpattro®, el primer producto basado en RNA pequeño de interferencia (siRNA) vehiculizado en nanopartículas lipídicas para tratar la amiloidosis hereditaria por transtiretina (273,274). En 2020, Comirnaty®, una vacuna de RNA mensajero (mRNA) contra el virus SARS-CoV-2, causante del Covid-19, recibió aprobación de emergencia para aplicarse a la inmunización global en el combate de la pandemia enfrentada por dicha enfermedad (275,276). Más recientemente, en el año 2023, Casgevy® recibió aprobación regulatoria como terapia basada en la edición génica mediante CRISPR/Cas9 para la anemia de células falciformes (210). La Figura 7 muestra la evolución de las aprobaciones de medicamentos basadas en nanotecnología hasta el año 2021.

Entre las nanopartículas aplicadas como sistemas de liberación de fármacos aprobadas por la FDA y la Agencia Europea del medicamento (EMA) se incluyen principalmente nanopartículas lipídicas, nanocristales y nanopartículas poliméricas. El mercado farmacéutico relacionado con la nanotecnología está centrado principalmente en el tratamiento de cáncer e infecciones, trastornos del sistema nervioso y enfermedades cardiovasculares (259,261,277). La Figura 8 ofrece una ilustración de la distribución actual del mercado farmacéutico según la gama de productos ofrecidos por 16 empresas líderes en el campo biotecnológico, agrupadas bajo el Consorcio Internacional para Innovación y Calidad en el Desarrollo Farmacéutico, presentada en la publicación ejecutada por Jeffrey D. Clogston y colaboradores (276).

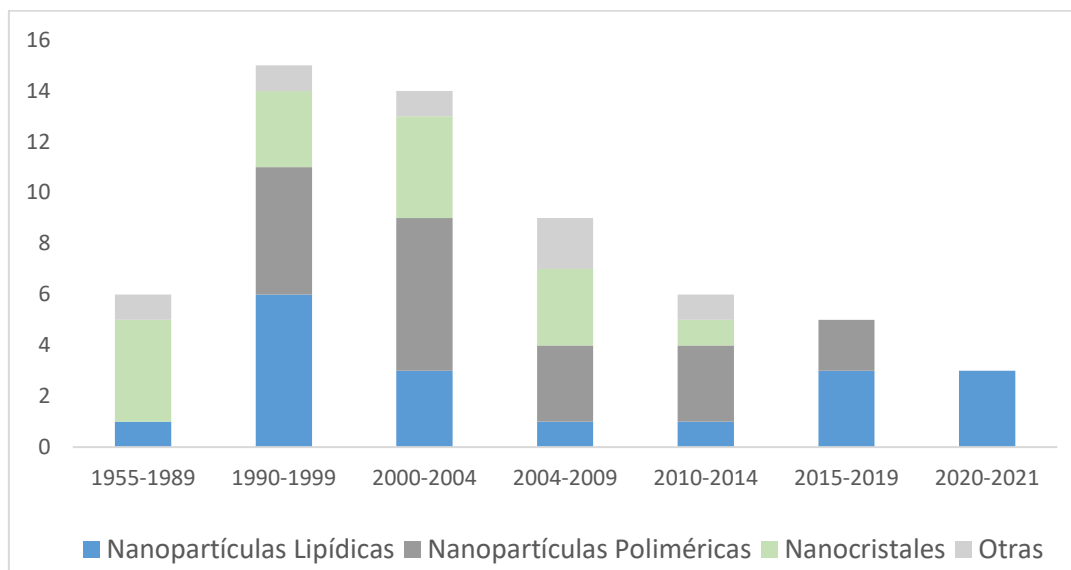


Figura 7: Evolución de la aprobación de medicamentos basados en nanotecnología (1955-2021)

Se muestra la distribución temporal de las aprobaciones por parte de la FDA de medicamentos basados en nanotecnología. Se destaca un periodo inicial largo de latencia, con un notable incremento en las aprobaciones durante la década de 1990, período en que se introduce el medicamento Doxil®. En los últimos 10 años se observa una tendencia creciente en nanopartículas lipídicas, las cuales representan además las todas las aprobaciones del segmento más reciente, que abarca un periodo más corto en comparación con los anteriores. Figura de elaboración propia a partir de la información de las referencias (263,264,267,278).

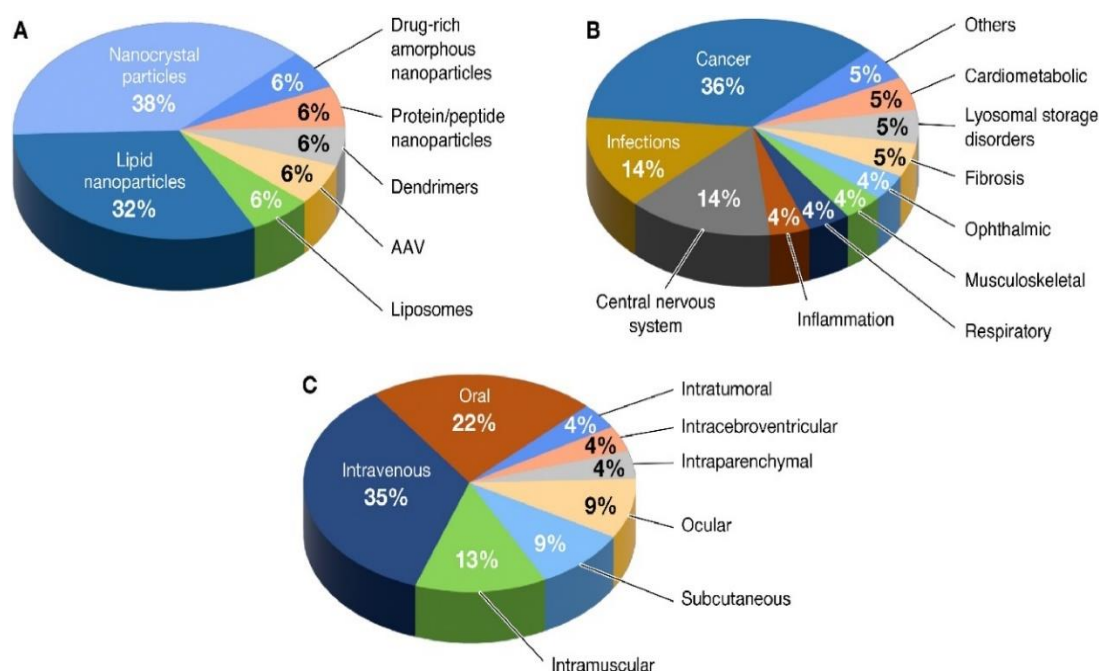


Figura 8: Clasificación de los productos nanotecnológicos comercializados actualmente

La información de esta figura clasifica los productos relacionados con nanotecnología según una encuesta a 16 empresas líderes que conforman el Consorcio Internacional para Innovación y Calidad en el Desarrollo Farmacéutico. Los productos están organizados por: A) tipo de nanomaterial, B) indicación terapéutica y C) ruta de administración. A: Nanocristales y nanopartículas lipídicas corresponden a más de dos tercios del total de desarrollos en el mercado. B: El cáncer es la indicación terapéutica predominante, representando más de un tercio del total. Las enfermedades infecciosas y trastornos del SNC, son la segunda y tercera indicación más importante, y combinados acumulan menos productos que los tratamientos oncológicos. C: La administración intravenosa es la vía más utilizada. Si se combinan la vía intravenosa, intramuscular y subcutánea, representan casi el 60% de todas las vías de administración, mientras que la vía oral abarca un 22%. Figura reproducida de (276).

El comportamiento del mercado en las últimas tres décadas y la creciente aceptación por las agencias regulatorias, impulsada por los avances significativos de los últimos años en la vehiculización de RNA, indican un futuro prometedor para los desarrollos relacionados con la nanotecnología (214,276,279). A pesar de los elevados costos asociados con estos productos (280,281), las empresas farmacéuticas están concentrando una importante cantidad de recursos para impulsar el desarrollo de tecnologías basadas en nanotecnología, y se puede anticipar un impacto continuo y significativo de la nanotecnología en el mercado farmacéutico (264). Las estimaciones del valor de mercado global para este tipo de productos rondan los 200 billones de dólares para el año 2024 y 350 para el año 2025 (261,278).

Más allá del panorama actual, el estudio de Colgstrom y colaboradores amplía la perspectiva incluyendo un análisis exhaustivo del portafolio general de productos nanotecnológico a través de la base de datos PharmaCircle™ “Pipeline and Product Intelligence” (276). Evaluando más de 1400 productos en diversas etapas de su ciclo de vida, este estudio proporciona una visión profunda del impacto potencial y futuro en el sector. La Figura 9 muestra los principales resultados de este análisis que, al compararse con los datos de la Figura 8, destaca cambios importantes en las tendencias de los productos en desarrollo y la posible evolución del mercado. Entre estos cambios se observa un crecimiento predominante de nanopartículas lipídicas, un incremento de los desarrollos enfocados en enfermedades infecciosas, y un aumento en la adopción de la vía intramuscular para la administración de medicamentos.

Estos datos sugieren un elevado potencial traslacional y un crecimiento expansivo para las aplicaciones farmacéuticas de la nanotecnología que se experimentarán en el futuro cercano. Es posible anticipar una posible penetración en nuevas áreas terapéuticas, fundamentado en el dinamismo constante que es fruto de la versatilidad de las aplicaciones nanotecnológicas, que les permite adaptarse a diferentes requerimientos terapéuticos.

1.2.4 Tipos de nanomateriales empleados como sistemas de liberación de fármacos

Existe un amplio abanico de nanoestructuras que han sido investigadas como aplicaciones de sistemas de liberación de fármacos, y mientras que algunos tipos tienen aplicaciones clínicas más avanzadas, constantemente se investigan nuevas aplicaciones que podrían, en un futuro, llegar a enriquecer y diversificar las opciones terapéuticas disponibles. Estos nanomateriales varían en composición, estructura y funcionalidad, así como en las características particulares que les confieren ventajas de cara a las posibles aplicaciones biomédicas (196,236). La Figura 10 ilustra algunos de los materiales tradicionales más empleados para la vehiculización de fármacos agrupados en 4 categorías principales.

1.2.4.1 Nanomateriales poliméricos

1.2.4.1.1 Dendrímeros

Los dendrímeros son nanopolímeros altamente ramificados y compartimentalizados, que proporcionan una estructura tridimensional uniforme y definida (262,282). Pueden llegar a tener dimensiones de entre 1 a 5 nm y pueden albergar moléculas dentro de sus cavidades con una alta eficiencia de carga. Los grupos libres en la estructura de los dendrímeros pueden ser modificados superficialmente para mejorar sus características de biocompatibilidad, solubilidad y permeabilidad, así como para lograr el direccionamiento activo (267). Para la preparación de dendrímeros se han utilizado moléculas biológicas como genes, fármacos o vacunas, así como monómeros o copolímeros de quitina, polietilénimina, poliamidoamina o poli(propilénimina) (283,284).

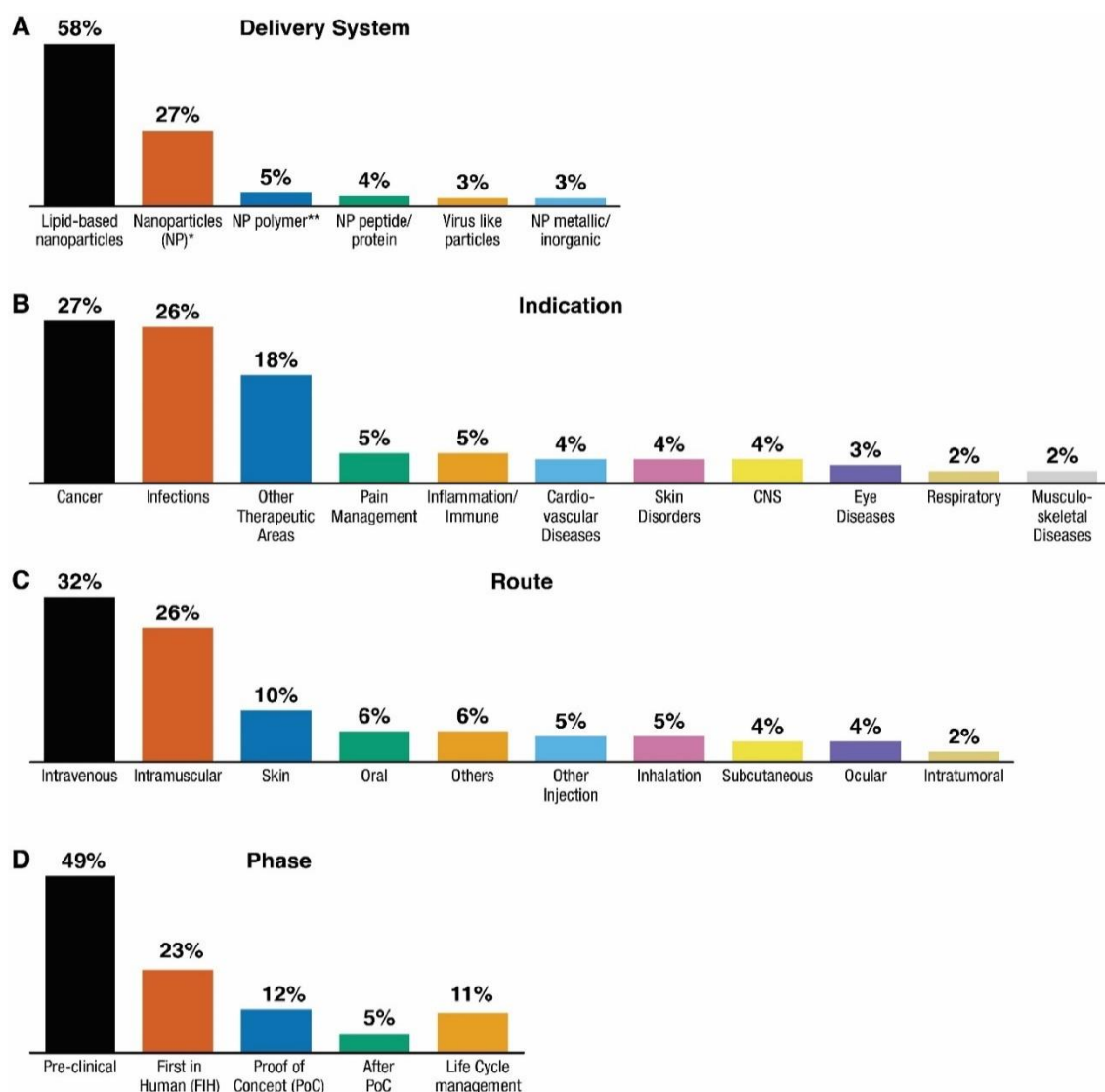


Figura 9: Clasificación de los productos nanotecnológicos contemplando todo el ciclo de vida del medicamento
 Esta figura clasifica los productos nanotecnológicos de acuerdo con su estado en el ciclo de vida, según la base de datos PharmaCircle™ “Pipeline and Product Intelligence”. A: Considerando el ciclo de vida completo, las nanopartículas lipídicas concentran el 58% de la cartera. B: Aunque la nanotecnología sigue siendo una estrategia ampliamente utilizada para el tratamiento del cáncer, la tendencia emergente más notable es el considerable aumento en los desarrollos para el abordaje de enfermedades infecciosas. C: La administración parenteral continúa mostrando predominancia, con una reducción la utilización de la vía oral. Es notable un aumento de desarrollos para ser administrados por la vía intramuscular, la cual es menos riesgosa y más conveniente para los pacientes, comparada con la vía intravenosa. D: La mayoría de los desarrollos actuales se localizan en la fase preclínica. Los estudios clínicos fase I (*First in human*), fase II (*Proof of concept*) y fase III (*After PoC*) agrupan un 23, 12 y 5% de los productos del portafolio, respectivamente. Figura reproducida de (276).

1.2.4.1.2 Nanopartículas poliméricas

Basadas en polímeros sintéticos o naturales, el ensamblaje de materiales biocompatibles y biodegradables, permiten ajustar las características de liberación de los agentes terapéuticos integrados, así como su liberación superficial. Las nanopartículas poliméricas se pueden preparar por distintos métodos tanto a partir de polímeros naturales, como el quitosano, gelatina, albúmina o alginato, o polímeros sintéticos como el ácido (D,L) poliláctico (PLA), ácido poli(D,L-lactic-co-glicólico) (PLGA), and poli(ε-caprolactona) (PCL) y sus copolímeros (267,285,286). Estos materiales tienen la capacidad de modificar las condiciones de liberación gracias al comportamiento de los materiales poliméricos en respuesta a estímulos ambientes como la temperatura o el pH (287).

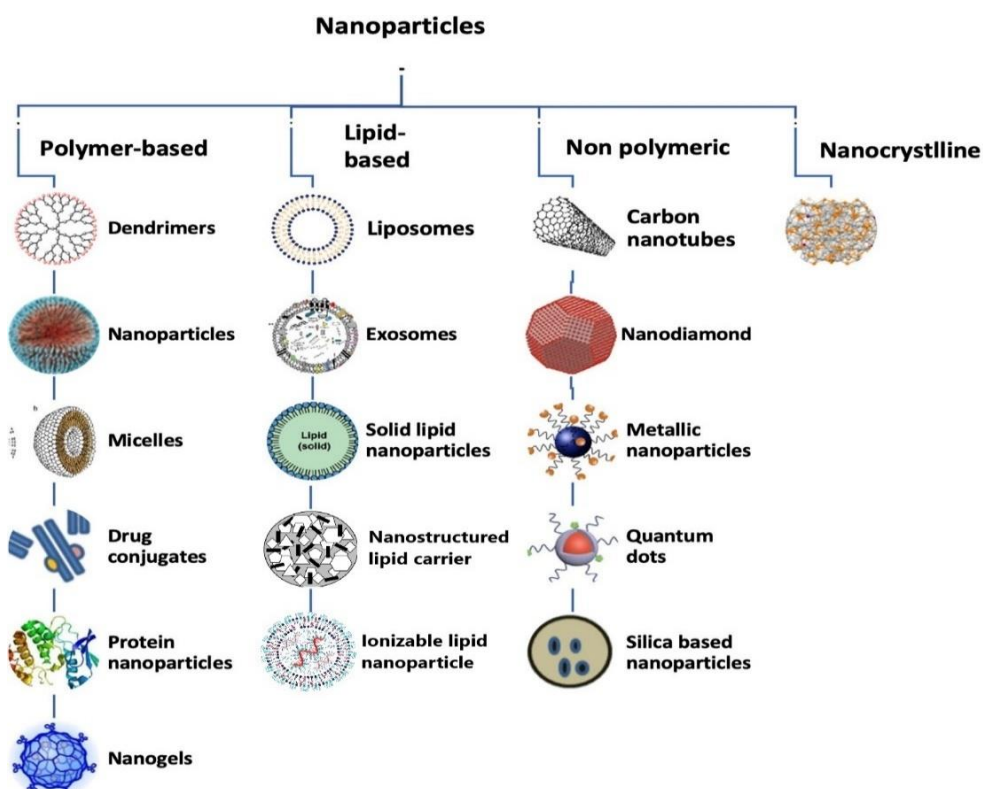


Figura 10: Tipos de nanomateriales empleados como sistemas de liberación de fármacos

Agrupados según cuatro categorías principales de nanopartículas poliméricas, lipídicas, no poliméricas (conocidas también como inorgánicas) y nanocristales. Figura modificada de(286,298,299).

1.2.4.1.3 Micelas

Las micelas son estructuras coloidales que se forman por el auto-ensamblaje de moléculas anfifílicas en solución empleadas por su capacidad de mejorar la solubilidad y estabilidad de fármacos hidrofóbicos. Los constituyentes de las micelas se estructuran de forma esférica, con los grupos hidrofílicos rodeando los grupos hidrofóbicos, encapsulando los medicamentos hidrofóbicos en su interior (267,289).

1.2.4.1.4 Conjugados fármaco-polímero

Especialmente aplicado en oncología, la conjugación de polímeros con moléculas pequeñas aumenta su peso molecular, lo que altera su distribución y afinidad con las células. Además, mejoran la estabilidad, la solubilidad y permeabilidad. Ante la presencia de enlaces sensibles al pH, estos conjugados puede liberar las moléculas en sitios específicos, mejorando el direccionamiento (267,290,291).

1.2.4.1.5 Nanopartículas proteicas

El ensamblaje de estructuras proteicas para formar nanopartículas también posee la capacidad de encapsular moléculas con aplicaciones terapéuticas. Un ejemplo de su aplicación clínica es el Abraxane®, el cuál corresponde a una nanopartícula de albúmina para la administración de paclitaxel y que mejora el perfil de distribución y reduce la toxicidad sistémica del fármaco, comparado con su administración libre (292,293). Bajo esta categoría también pueden clasificarse los virus, enzimas, o “partículas semejantes a virus” (*virus-like particles*) que se obtienen mediante actividad recombinante y permiten la administración de *small molecules* y de genes. Sus aplicaciones incluyen el desarrollo de vacunas, la imagenología y la síntesis de materiales (286,311).

1.2.4.1.6 Nanogeles (o hidrogeles)

Los nanogeles (o hidrogeles) son redes poliméricas coloidales que se hinchan al entrar en contacto con un fluido y con una reticulación menor a 100 nm. Los nanogeles ofrecen varias ventajas como la reducción de fugas prematuras de medicamentos, la posibilidad de encapsulación de múltiples moléculas terapéuticas en una misma formulación y su fácil administración por vías parenterales o mucosas. Pueden ser utilizados en la producción de lentes de contacto, productos de higiene y apósitos para heridas; además de aplicaciones en ingeniería de tejidos y para la preparación de sistemas de liberación controlada de fármacos. Esta liberación puede ser controlada por el hinchamiento y cambios conformacionales en su red estructural en respuesta a estímulos (267,295,296).

1.2.4.2 Nanomateriales inorgánicos

1.2.4.2.1 Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono son estructuras tubulares basadas en carbono, con diámetros de solo 1 nm y hasta 100 nm de largo. Se fabrican enrollando una sola capa de grafeno en un cilindro (267). Poseen un tamaño y forma estable, y muestran una alta capacidad de penetrar membranas celulares (297). Los nanotubos de carbono pueden ser funcionalizados para encapsular y dirigir agentes terapéuticos a sitios específicos en el cuerpo. Diversos estudios han demostrado el potencial de los nanotubos de carbono para administrar medicamentos anticancerígenos, antibióticos y otras moléculas terapéuticas. La funcionalización superficial de los nanotubos de carbono facilita la unión de fármacos y ligandos, para el direccionamiento activo (267,298).

1.2.4.2.2 Nanodiamantes

Los nanodiamantes son un tipo de nanopartículas de carbono con un tamaño menor de 100 nm y se producen mediante técnicas como la deposición química de vapor, detonación y métodos de alta temperatura/presión (267). Los nanodiamantes poseen propiedades especiales como propiedades electrostáticas superficiales, baja citotoxicidad del núcleo químicamente inerte, y una fotoestabilidad muy alta, lo que los hace excelentes para aplicaciones médicas como la resonancia magnética, la fabricación de lentes de contacto y la vehiculización de fármacos (267,299,300).

1.2.4.2.3 Nanopartículas metálicas

Este tipo de nanomateriales posee diámetros de entre 1 y 100 nm, y están compuestos típicamente de metales como oro, cobalto, níquel, hierro y sus óxidos. Se pueden sintetizar y modificar fácilmente para ser decoradas con diversas moléculas, incluyendo *small molecules* y biomoléculas como ácido desoxirribonucleico (DNA) y proteínas (267,301). Estas partículas son biocompatibles y estables. Además, sus características magnéticas permiten que mediante campos magnéticos externos puedan ser guiadas hacia ubicaciones específicas en el cuerpo (356). Las nanopartículas metálicas poseen aplicaciones tanto para propósitos terapéuticos como diagnósticos principalmente en el campo oncológico (300,302,303).

1.2.4.2.4 Quantum Dots

Los quantum dots (o puntos cuánticos) son pequeñas partículas que miden entre 2 y 10 nm, y que exhiben unas propiedades electrónicas y ópticas únicas (267,304). Estos materiales se destacan por sus intensas fluorescencias en colores específicos. Además, la superficie de los QDs

permite la conjugación con biomoléculas como péptidos, proteínas y DNA para aplicaciones específicas, tales como la liberación dirigida de fármacos y diagnóstico por imágenes (267). Los materiales más usados para preparar *quantum dots* para la vehiculización de fármacos son el carbono, el grafeno y el óxido de zinc, aunque también se emplean de diferentes metales para propósitos diagnósticos (305,306). Las ventajas de los *quantum dots* como sistemas de vehiculización de fármacos radica en su capacidad de cruzar membranas celulares, su elevada área superficial específica y su capacidad de carga a través de interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals (a través de interacciones de apilamiento aromático o π *stacking*) (304).

1.2.4.2.5 Nanopartículas a Base de Sílica

Las nanopartículas de sílica se distinguen por su capacidad para ser moldeadas en estructuras complejas y altamente porosas. Además, su superficie está recubierta por unidades de silanol que facilitan la adsorción de grupos polares. Los poros de estas nanopartículas pueden ser funcionalizados con diversas moléculas que, en respuesta a estímulos específicos, potencialmente pueden conferirle una liberación controlada del fármaco (267,307).

1.2.4.3 Nanocristales

Los nanocristales se componen principalmente de ingredientes farmacéuticos activos cristalinos, con apenas el uso de agente estabilizadores a bajas concentraciones. Estos sistemas se aplican a fármacos poco solubles, y en los que su forma en nanocristales mejora su solubilidad aparente en agua y su biodisponibilidad. Estos aspectos permiten que los nanocristales contengan una mayor concentración y eficiencia de carga del fármaco (267,308).

Cada tipo de nanomaterial destaca por propiedades únicas que le confieren idoneidad para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas específicas (214,215). También existen las nanopartículas híbridas, que combinan materiales de diferentes naturalezas para potenciar sus propiedades (309). Por ejemplo, es posible encontrar nanopartículas híbridas de metal-lípido (310), lípido-polímero (311), o carbono-polímero (312). Estas combinaciones tienen la ventaja de crear una sinergia entre los componentes, lo que permite mejorar características como la estabilidad, la adaptabilidad de los métodos de fabricación, la eficacia en la liberación de fármacos, y la biocompatibilidad, optimizando su desempeño en aplicaciones terapéuticas o diagnósticas (309,313).

En los próximos años, es previsible que se intensifiquen las investigaciones y aplicaciones inspiradas en estos materiales, e incluso que surjan nuevos nanomateriales destinados a exploración en el ámbito biomédico (314,315). Particularmente, las nanopartículas lipídicas se perfilan como los nanomateriales con el mayor desarrollo clínico y con las proyecciones más prometedoras hacia el futuro (276). Dada esta perspectiva, el enfoque de esta introducción y este trabajo se centrará en profundizar en los métodos de fabricación, desafíos inherentes, y aplicaciones de las nanopartículas lipídicas, y particularmente, en su utilidad específica como medio para enfrentar el desafío del transporte de fármacos a través de la BHE.

1.2.4.4 Nanomateriales lipídicos

Lo datos expuestos desde la Figura 7 hasta la Figura 9 denotan una relevancia creciente en la aplicación clínica de las nanopartículas lipídicas, que es palpable también en el volumen de producción de literatura científica (126,316–325). Su predominancia se debe principalmente a que ofrecen una mayor biocompatibilidad y afinidad con tejidos, principalmente por la mayor

similitud con las membranas celulares (321,326,327). La Figura 11 ilustra las diferencias estructurales entre los principales tipos de nanopartículas lipídicas aplicadas como vehículos para el desarrollo de medicamentos.

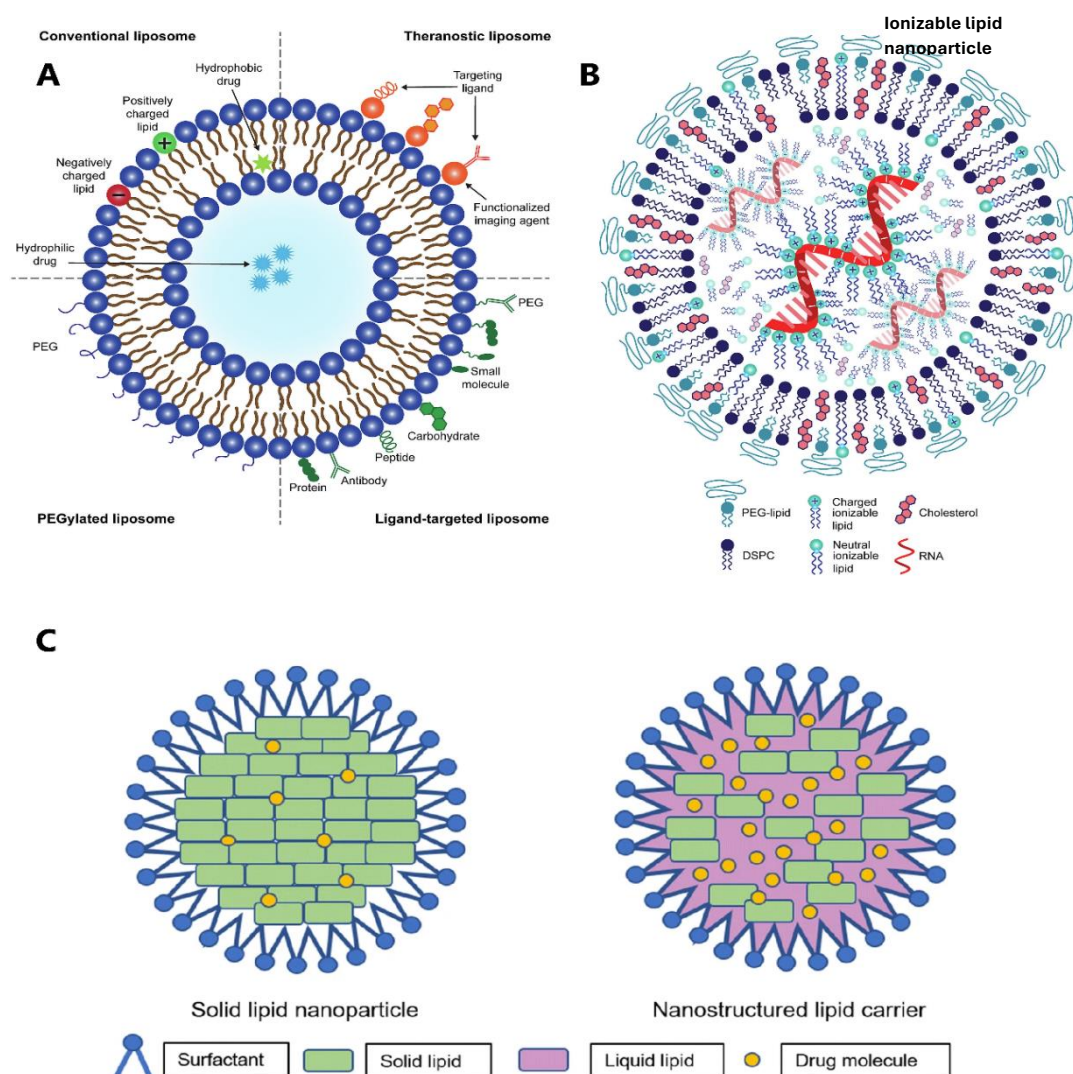


Figura 11: Tipos de nanopartículas lipídicas empleadas como sistemas de liberación de fármacos

- A) Estructura de un liposoma unilamelar, capaz de transportar medicamentos hidrofóbicos dentro de su doble capa lipídica y medicamentos hidrofílicos en su núcleo acuoso. El panel divide el liposoma teóricamente en 4 secciones, mostrando variantes y posibles modificaciones superficiales para modular características y aplicaciones del sistema. Estas modificaciones pueden aplicarse también a los otros tipos de nanopartículas lipídicas descritos. B) Nanopartícula de lípido ionizable, especializado para la vehiculización de RNA. Su composición incluye lípido ionizable, colesterol fosfolípido (DSPC) y lípido pegilado. C) Las nanopartículas lipídicas sólidas (izquierda) corresponden a una matriz de lípido sólido en la que se encuentra entrelazado el fármaco, mientras que en la estructura de los transportadores lipídicos nanoestructurados (a la derecha) se incorpora una mezcla de lípidos sólidos y líquidos que permite crear una matriz menos ordenada que facilita una mayor capacidad de carga y una liberación más controlada de fármaco. Figura modificada (298,326).

1.2.4.4.1 Liposomas

Los liposomas (Figura 11-A) son estructuras esféricas con una bicapa lipídica que rodea un núcleo acuoso, descubiertos en la década de 1960. Fueron el primer nanotransportador lipídico descrito y quizá el más representativo de ellos (327,328). Su estructura le permite cargar moléculas tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, incorporadas en su núcleo acuoso o dentro de la bicapa lipídica, respectivamente. Los liposomas tienen la capacidad de fusionarse con

membranas celulares, liberando su contenido directamente en el citoplasma, lo que los hace sistemas transportadores eficaces para la entrega selectiva de terapias. Los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, dependiendo del número de bicapas lipídicas que contengan (286,329,330)

Estos vehículos se han utilizado en aplicaciones terapéuticas como la detección y tratamiento de tumores, terapia antibacteriana, vacunación e incluso entrega dirigida de fármacos al cerebro. Las modificaciones en la superficie, como el revestimiento con polímeros funcionalizados o cadenas de polietilenglicol (PEG), facilitan la distribución específica del objetivo y mejoran el tiempo de circulación en sistemas biológicos (267).

1.2.4.4.2 Nanopartículas lipídicas sólidas

Las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) están compuestas principalmente por un núcleo lipídico que es sólido a temperatura ambiente, incluyendo también triglicéridos, ácidos grasos, ceras y surfactantes (328,331). Poseen una estructura cristalina altamente ordenada donde se incorpora el fármaco en su interior (Figura 11-C, a la izquierda). Ofrecen estabilidad, protección y liberación controlada del fármaco (299,331). Sin embargo, enfrentan desafíos como una capacidad limitada de carga, y expulsión del fármaco a largo plazo, debido a transiciones polimórficas (331).

1.2.4.4.3 Transportadores lipídicos nanoestructurados

En contraste con las SLNs, que consisten en lípidos completamente cristalizados, los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLCs) incorporan lípidos líquidos dentro de su matriz (Figura 11-C, a la derecha). Esta estructura permite a los NLCs ofrecer una mayor capacidad de carga y estabilidad mejorada. La presencia de lípidos líquidos disminuye la cristalinidad del sistema, previniendo la expulsión del medicamento durante su almacenamiento (328,334). Estos transportadores lipídicos de segunda generación se pueden clasificar en tres subtipos de acuerdo con el grado de ordenamiento de su estructura: imperfectos, amorfos o múltiples, como se ilustran en la Figura 12 (333). En los NLCs imperfectos se presenta una matriz altamente desordenada que combina lípidos sólidos y varios tipos de lípidos líquidos. Esto permite una alta capacidad de carga de fármacos, pero con una eficiencia de encapsulación relativamente baja debido a la solubilidad limitada de los fármacos en los lípidos sólidos. Por otro lado, los NLCs contienen una cantidad mayor de un lípido sólido que presente una cristalinidad muy baja, formando así una estructura sólida amorfa. Finalmente, los NLCs múltiples se caracterizan por un alto contenido de lípido líquido (aceite), cuya presencia induce una separación de fases localizada que provoca la formación de pequeños nanocompartimentos de aceite dentro de la matriz sólida (335).

1.2.4.4.4 Nanopartículas de lípido ionizable

Las nanopartículas lipídicas ionizables son sistemas de vehiculización más modernos que han ganado relevancia y evolucionado de la mano de los desarrollos de sistemas de vehiculización de ácidos nucleicos (336,337). Su uso es tan estandarizado para vehiculizar este tipo de moléculas que en ese contexto se les refiere únicamente como nanopartículas lipídicas (LNPs) sin que con ello se confunda, dentro de esa rama, con SLNs, NLCs o liposomas (230,322,338–341). Corresponden al sistema de vehiculización más avanzado clínicamente para mantener la estabilidad de los ácidos nucleicos terapéuticos y lograr una entrega efectiva de siRNA y mRNA (342–344), así como aplicaciones de CRISPR-Cas9 y otras herramientas de edición génica (343–345).

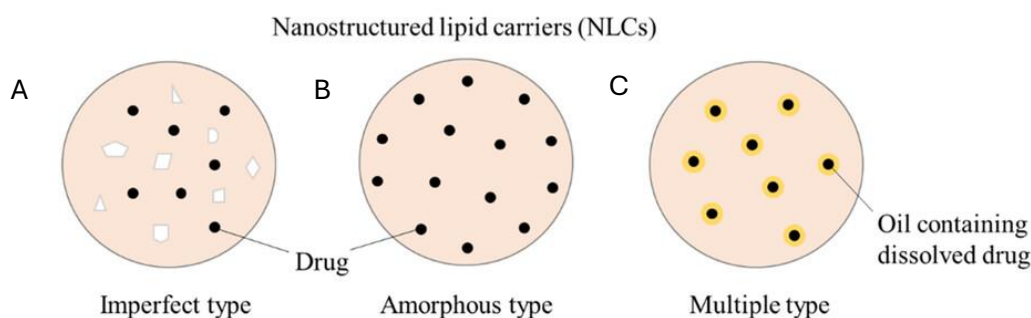


Figura 12: Subtipos de transportadores lipídicos nanoestructurados

A: En los NLCs de tipo imperfecto, el fármaco (puntos negros) se encuentra dentro de una matriz de lípido sólido (fondo de tonalidad naranja claro) y una mezcla de diferentes tipos de lípidos líquido. B: El tipo amorfo emplea lípidos sólidos con baja cristalinidad. C: En los NLCs de tipo múltiple, el fármaco se encuentra disperso dentro de pequeños compartimentos de aceite dentro de la matriz sólida. Modificado de: (333).

Debido a su relativa novedad, algunas revisiones en el campo de las nanopartículas lipídicas aún no las incluyen como una categoría, lo que podría provocar que las LNPs sean erróneamente categorizadas como liposomas o incluso NLCs (267,288,333). Sin embargo, las LNPs presentan diferencias estructurales y funcionales que las diferencian claramente de los otros tipos de nanopartículas lipídicas (337,348). Están compuestos por cuatro tipos básicos de lípido, incluyendo: lípidos ionizables, fosfolípidos, colesterol y lípidos PEGilados, como se ilustra en la Figura 11-B (279,333,339). Esta formulación es la base de productos que han avanzado a la aplicación clínica como el Onpattro® y el Comirnaty® (347,348).

Las LNPs tienen carga positiva en pH ácido, lo que les permite unirse a los ácidos nucleicos de carga negativa ajustando el pH durante la fabricación. Sin embargo, a pH fisiológico son de carga neutra, lo que puede reducir los efectos tóxicos durante la circulación sistémica (336,337,339). Las LNPs pueden internalizarse en las células mediante endocitosis y luego liberar los medicamentos en el citoplasma a través de la fuga endosomal, lo que juega un papel crucial en la función intracelular del RNA, protegiéndolo de la degradación y permitiendo que el ácido nucleico entre en las células (320,331,349,350).

1.2.5 Métodos de fabricación de nanopartículas lipídicas

Las técnicas para la fabricación de nanoestructuras pueden dividirse en dos categorías principales: los métodos “de arriba hacia abajo” (*top-down*) y los métodos “de abajo hacia arriba” (*bottom-up*) (353,354). En el primer caso, las técnicas se basan en la reducción de estructuras de mayor tamaño para obtener materias a escala nanométrica (174). Por el contrario, los métodos “de abajo hacia arriba” siguen una estrategia en la que las nanoestructuras se forman al ensamblar átomos o moléculas de manera controlada (127). Según esta clasificación, la mayoría de los métodos empleados para la síntesis de nanopartículas lipídicas corresponden a la categoría de métodos de “de abajo hacia arriba”(355).

La elección del método de síntesis de las LNPs es crucial para determinar sus aplicaciones terapéuticas, ya que influye directamente en sus propiedades fisicoquímicas, en la eficiencia de carga de fármacos, en su estabilidad y en su comportamiento *in vivo*. Cada método de síntesis de LNPs produce nanopartículas con características específicas que afectan directamente a su rendimiento en diversas aplicaciones terapéuticas (355).

1.2.5.1 Métodos para la fabricación de SLNs y NLCs

Los métodos tradicionales involucrados en la fabricación de SLNs y NLCs incluyen técnicas como la doble emulsión, inyección de solvente, microemulsión en frío, ultrasonicación, secado por aspersión, emulsificación y evaporación de solvente, método de fluido súpercrítico, homogenización en frío y homogenización en caliente, y homogenización a alta presión, entre otros (355–358).

Estos métodos pueden clasificarse en distintas categorías no relacionadas entre sí. Por ejemplo, se pueden clasificar según la demanda energética y el estrés que imponen sobre los materiales (como la baja demanda en microemulsión en frío o inyección de solventes, frente a la alta demanda en homogenización en caliente) (358) o según la facilidad de escalamiento (relativamente fácil para homogenización a alta presión o mezcla microfluídica, moderada para inyección de solventes, y baja para ultrasonicación y microemulsión) (320,358).

Estas características distintivas pueden orientar la selección de un método sobre otro, dependiendo de las aplicaciones específicas, las propiedades deseadas de las nanopartículas y las características de los materiales utilizados. Esto incluye, crucialmente, la estabilidad del principio frente al método de fabricación elegido (355,359).

Por ejemplo, al seleccionar un método como el de homogenización en caliente, ampliamente utilizado para preparar SLNs, se debe considerar que los materiales se someten a un alto estrés que puede afectar la estabilidad de principios activos termosensibles. Además, este método puede resultar en una alta variabilidad del tamaño de las partículas (alta polidispersidad) (358). Por otro lado, aunque el método de la microemulsión en frío no implica un alto estrés térmico, se trata de un método más laborioso y en el que típicamente se consiguen concentraciones bajas de nanopartículas (358).

1.2.5.2 Métodos para la fabricación de Liposomas y LNPs

Los liposomas y las LNPs pueden producirse mediante varios métodos. Entre los métodos tradicionales se encuentran la extrusión, la sonicación, la homogenización en caliente, y la hidratación de película lipídica. Además, técnicas emergentes como el método de inyección de etanol y sus variantes han irrumpido en la última década como alternativas con mejores características de robustez, reproducibilidad y escalabilidad de los procesos (339,360).

El método de hidratación de película delgada (o hidratación de película) es uno de los métodos más comunes para la producción de liposomas (361). Se considera un enfoque "de arriba hacia abajo", en el que grandes vesículas lipídicas se transforman en vesículas más pequeñas mediante técnicas de reducción de tamaño que requieren alta energía. Los lípidos se disuelven en un solvente orgánico (como cloroformo) y luego se transfieren a un recipiente de acero o a un matraz de fondo redondo. El solvente orgánico se elimina al vacío, lo que resulta en una película de lípidos en la superficie del recipiente (356). Al hidratar esta película con una solución acuosa, se forman vesículas multilamelares grandes y heterogéneas, con tamaños que varían en varios micrómetros. Para reducir el tamaño, se utilizan técnicas como la extrusión, que implica forzar la suspensión de partículas a través de un filtro de policarbonato o inorgánico con un tamaño de poro específico (por ejemplo, 100 nm), generando vesículas unilamelares del tamaño correspondiente (339).

La sonicación es una alternativa para reducir el tamaño, utilizando un sonicador de sonda o un baño de sonicación. Sin embargo, este método ofrece menos control sobre el tamaño final en comparación con la extrusión. El tamaño final depende de la composición lipídica y del tiempo de sonicación. Para lotes más grandes, se puede emplear también la homogenización a alta presión (339).

El método de hidratación de película presenta varias desventajas. Entre ellas se encuentran la presencia de solventes residuales y una baja capacidad de carga del medicamento. Además, este método genera una alta polidispersidad y produce estructuras multilamelares de manera no controlada. Además, es un método laborioso y con muchas etapas, siendo un proceso costoso y difícil de escalar a lotes industriales. Las fases de evaporación del solvente orgánico, extrusión y carga pasiva de liposomas son procesos que requieren mucho tiempo, especialmente en volúmenes grandes asociados a una producción a escala industrial (356,362). Los métodos de reducción de tamaño, como la extrusión o la sonicación pueden enfrentar también problemas de escalabilidad por el riesgo de obstrucción, degradación y contaminación asociado al procesamiento de grandes volúmenes(356,362).

El método de inyección de etanol se desarrolló como una mejora al método de hidratación de película. En este proceso, una solución de lípidos en etanol se inyecta mediante una jeringa en un recipiente que contiene un tampón acuoso. La rápida dilución del etanol induce una supersaturación localizada de moléculas de lípido a causa del aumento de la polaridad. Este fenómeno lleva al autoensamblaje de las vesículas lipídicas en un tamaño pequeño y uniforme en un solo paso (339). Como evolución del método de inyección de etanol, los métodos microfluídicos realizan la mezcla de soluciones dentro del canal de un dispositivo microfluídico, permitiendo que la nanoprecipitación sea controlada mediante la regulación precisa del flujo de soluciones de lípidos (típicamente en etanol) y soluciones acuosas hacia el canal (355,356).

Estos métodos permiten una mezcla en línea muy rápida (en milisegundos) de volúmenes muy pequeños, ofreciendo resultados más uniformes y reproducibles que métodos tradicionales de mezcla a escala macrométrica (359,360,363). A través del control preciso del flujo, la mezcla microfluídica facilita una mayor parametrización, lo que a su vez brinda la posibilidad de realizar ajustes precisos en los parámetros de proceso y la optimización de condiciones de fabricación (339,355). Controlando los parámetros del proceso, los investigadores pueden personalizar características como el tamaño, carga superficial, la homogeneidad, la capacidad de carga y la estabilidad de las nanopartículas para aplicaciones terapéuticas específicas (128,355,364).

Los dispositivos microfluídicos están compuestos por canales de mezcla, conocidos como chips, con diámetros de algunas decenas de micras donde convergen las soluciones acuosas y lipídicas. Estos canales pueden incluir diseños especializados que interrumpen el flujo laminar, aumentando la velocidad y eficiencia de la mezcla (355,365,366). La variedad en los diseños de los chips se ejemplifica en la Figura 13.

En cuanto a las condiciones del proceso, los parámetros que más atención atraen son el flujo total (TF) y la proporción de flujo (FRR) (128). El TF se define como la suma del flujo acuoso y el flujo lipídico, mientras que el FRR es la relación entre el flujo de solución acuosa y el flujo de la solución lipídica (367). Adicionalmente, también se suelen considerar parámetros como diseño del chip, la tasa de mezcla, que depende del FT y FRR, así cambios en la concentración y composición de las fase lipídica y acuosa, la temperatura del proceso y la diálisis (128). Otro parámetro relevante para la síntesis de nanopartículas destinadas a encapsular ácidos nucleicos es la proporción nitrógeno a fósforo (proporción N/P, o *N/P ratio*). Ésta representa la proporción

molar entre nitrógeno positivamente cargado presente en el grupo amino del lípido ionizable y el fosfato cargado negativamente presente en los nucleótidos (368), y es un parámetro que busca controlar la capacidad de la nanopartícula para encapsular los ácidos nucleicos (369). La Figura 14 muestra algunas de las variables del proceso de mezcla microfluídica con mayor atención en la literatura científica.

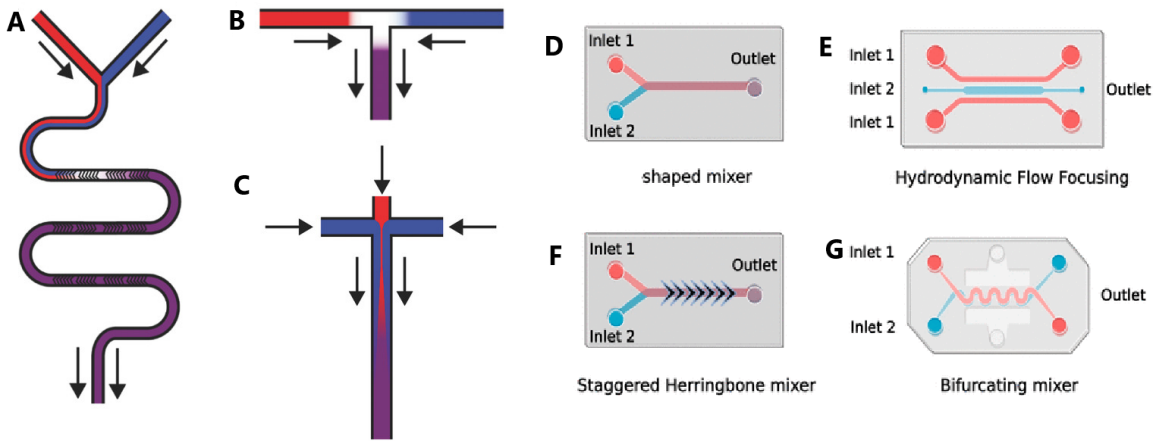


Figura 13: Diseños básicos de chips para mezcla microfluídica

Se muestran algunos ejemplos de varios tipos de diseños de chips que pueden utilizarse para fabricar nanopartículas mediante mezcla microfluídica. A y F: mezclador con deflectores de flujo escalonados en forma de espina de pescado (*staggered herringbone mixer*). B y D: Mezclador de convergencia simple, en forma de “T” o “Y”. C y E: Mezclador de focalización de flujo dinámico (hydrodynamic flow focusing). G: Mezclador por bifurcación. Imágenes modificadas de (339,355).

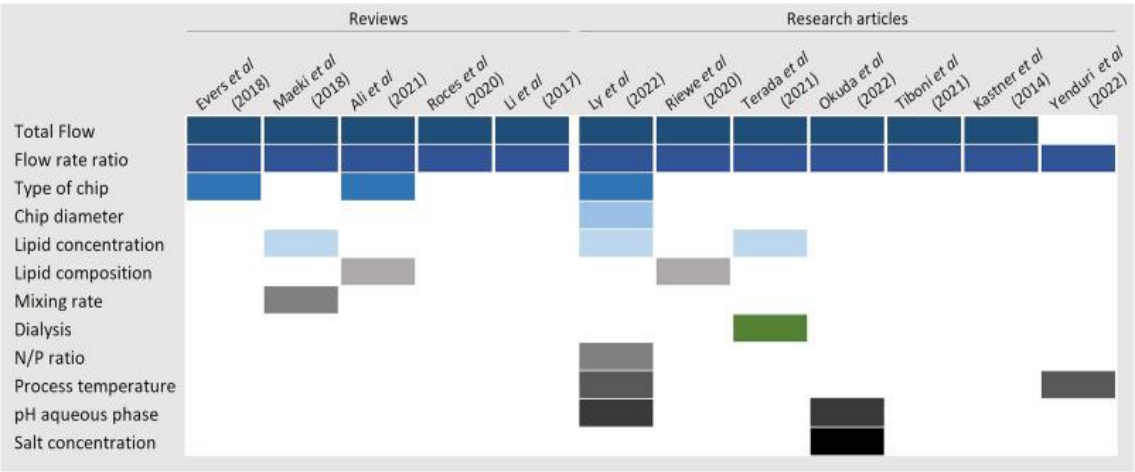


Figura 14: Variables del proceso de mezcla microfluídica

Parámetros identificados como críticos en revisiones bibliográficas o incluidas con al menos dos niveles de experimentación en artículos científicos. Reproducida de (128).

Esta técnica presenta posibilidades de escalamiento desde escala de laboratorios (algunos mililitros por hora) hasta escala industrial (litros por hora), particularmente a través de configuración de dispositivos de mezcla microfluídica en serie (367,370,371). La limitación más importante de este tipo de método de preparación de LNPs es el uso de solventes orgánicos que deben eliminarse para cumplir con las normativas de seguridad. El solvente más utilizado es el etanol por su aceptación en concentraciones de hasta un 0,5% y su facilidad de eliminación mediante diálisis (128,339).

Los métodos de fabricación mediante mezcla microfluídica desempeñan un papel crucial en el desarrollo de las LNPs, especialmente en la creación de vehículos para RNA utilizados en vacunas y otras alternativas terapéuticas. Esta tecnología es esencial para la síntesis de dichas nanopartículas y por ese motivo, en las últimas décadas, han evolucionado de forma conjunta (372). La combinación de LNPs y mezcla microfluídica se ha establecido como el estándar en la formulación de estas y otras terapias génicas, reflejando su importancia y efectividad en el campo (346,359,363,373–375).

1.2.6 Caracterización de nanopartículas lipídicas

Los atributos de calidad normalmente abordados para las LNPs son aquellos relacionados con su habilidad de penetrar las células diana y mostrar un efecto terapéutico, como el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI), la morfología, la carga superficial, la permeabilidad celular y la eficiencia de direccionamiento (376,377). La Tabla 1 enlista diferentes atributos que pueden ser evaluados y las respectivas técnicas analíticas disponibles (378,379).

Tabla 1: Características críticas en nanopartículas y técnicas analíticas disponibles

Característica	Técnicas analíticas disponibles
Tamaño (características estructurales)	TEM, XRD, DLS, NTA, SAXS, HRTEM, SEM, AFM, EXAFS, FMR, DCS, ICP-MS, UV-Vis, MALDI, NMR, TRPS, EPLS
Forma	TEM, HRTEM, AFM, EPLS, FMR, Tomografía 3D
Composición	XRD, XPS, ICP-MS, ICP-OES, SEM-EDX, NMR, MgFM, LEIS
Estructura cristalina	XRD, EXAFS, HRTEM, Difracción de electrones, STEM
Distribución de tamaño	DCS, DLS, SAXS, NTA, ICP-MS, FMR, Relajometría paramagnética, DTA, TRPS, SEM
Unión y densidad de ligando, composición superficial	XPS, FTIR, NMR, SIMS, FMR, TGA, SANS
Área superficial	BET, NMR líquido
Carga Superficial	Potencial Zeta, EPM
Concentración	ICP-MS, UV-Vis, RMM-MEMS, PTA, DCS, TRPS
Estado de Aglomeración	Potencial Zeta, DLS, DCS, UV-Vis, SEM, Cryo-TEM, TEM
Densidad	DCS, RMM-MEMS
Propiedades de partículas individuales	Sp-ICP-MS, MgFM, HRTEM, TEM líquido
Visualización en tres dimensiones	Tomografía 3D, AFM, SEM
Defectos estructurales	HRTEM, EBSD
Propiedades ópticas	UV-Vis-NIR, PL, EELS-STEM
Propiedades magnéticas	SQUID, VSM, Espectroscopía Mössbauer, MgFM, FMR, XMCD, Susceptibilidad magnética

Nota: Refiérase al listado de abreviaturas al inicio de la tesis para las definiciones de los términos utilizados en esta tabla.

El desempeño biológico y aplicabilidad clínica de estos materiales se relacionan estrechamente con sus propiedades fisicoquímicas (376). Por lo tanto, la caracterización de los materiales es crucial para optimizar su efectividad y seguridad, facilitando la traslación hacia aplicaciones clínicas reales (380). Asegurar el entendimiento de cómo los procesos de formulación impactan en esos atributos es crucial para asegurar el éxito de las nanopartículas, pudiendo realizar esta exploración desde la perspectiva Calidad por Diseño (QbD) en la formulación de medicamentos (128,321).

1.2.7 Aplicación de QbD en el desarrollo de nanopartículas como sistemas de liberación de fármacos

El enfoque tradicional en el desarrollo de medicamentos, basado en la “calidad por evaluación” a través de la prueba y error ha caído en desuso debido a los riesgos que representa para la calidad de los productos (381). Hoy en día, el QbD es una metodología armonizada y adoptada por diversas autoridades regulatorias de referencia, siendo considerada como el estándar en el desarrollo de medicamentos tradicionales para su comercialización (381,382). El principio fundamental del QbD es que la calidad debe ser incorporada en el proceso desde su diseño, y no ser simplemente evaluada en los productos terminados (383).

Aunque la aplicación del QbD de forma integral no es obligatoria para el registro de medicamentos, es altamente recomendada por las agencias regulatorias (384), y se ha adoptado ampliamente en la literatura científica, incluyendo numerosas publicaciones relacionadas con el desarrollo de nanoformulaciones en fase de investigación, por ejemplo: (381–387).

La implementación del QbD permite simplificar y reducir costos, previene la variabilidad, guía y mejora el proceso de diseño, y aumenta y facilita el posible manejo regulatorio (381). Todas estas características apuntan a generar productos más robustos y mejorar la traslación clínica de los desarrollos de nanotecnología (385).

Bajo este enfoque se identifican las características críticas de la formulación desde un inicio, y se establecen parámetros que garanticen la calidad en función de esas características (381). La guía ICH Q8 identifica los elementos claves del QbD, incluyendo el perfil de calidad de producto objetivo (QTPP), los atributos críticos de calidad (CQA), los atributos críticos del material (CMA), los parámetros críticos del proceso (CPP), análisis de riesgo, el Diseño de Experimentos (DoE), el espacio del diseño y la estrategia de control (381,385,388).

El QTPP es la suma de características que debe cumplir un producto para asegurar la calidad deseada, tomando en cuenta seguridad y eficacia de la formulación. Este elemento es fundamental para el desarrollo orientado por QbD, y debe ser definido claramente antes del inicio del proceso de formulación (389). Los CQA son características físicas, químicas, biológicas u otras que, cuando se encuentran dentro de un rango controlado, aseguran la calidad deseada. En otras palabras, son críticos en el cumplimiento del QTPP (390). Los CPP son las variables de proceso que tienen un efecto directo y significativo en los CQA (391).

Por otra parte, el DoE es una herramienta sistemática que permite planificar y ejecutar el estudio de los CPP a partir de un diseño predeterminado. Esta metodología facilita la recopilación de información sobre el comportamiento de los CQA ante diferentes configuraciones de CMA o CPP (392). Mediante estudios estructurados de cribado y exploración, el DoE permite obtener inferencias significativas, incluso con un número reducido de experimentos. Esto reduce el consumo de tiempos y recursos mientras se recaba la mayor cantidad de conocimiento en la evaluación de las respuestas (393). Además, los DoE permiten identificar configuraciones de CMA o CPP que resultan óptimas para asegurar el cumplimiento de los objetivos de calidad (381).

Ante esta exploración surge el concepto de espacio del diseño, el cual se refiere a un ámbito multidimensional en el que se conoce la relación entre las variables y parámetros de procesos, y los resultados de calidad (394). En otras palabras, son las diferentes combinaciones de CPP estudiadas en las que se puede operar, ya que se conoce que el diseño de la formulación

cumplirá con los requisitos de calidad trazados (381,395). Una de las principales ventajas de un espacio del diseño bien establecido es que los procesos de fabricación cuentan con flexibilidad de realizar cambios dentro de ese espacio, sin el riesgo de crear incertidumbre por dichos cambios ni que represente una reformulación del producto (385). La interdependencia e integración de los conceptos de QTPP, CQA, CMA, CPP, DoE y espacio del diseño con el resto de los elementos del proceso de desarrollo orientado por QbD se ilustra en la Figura 15.

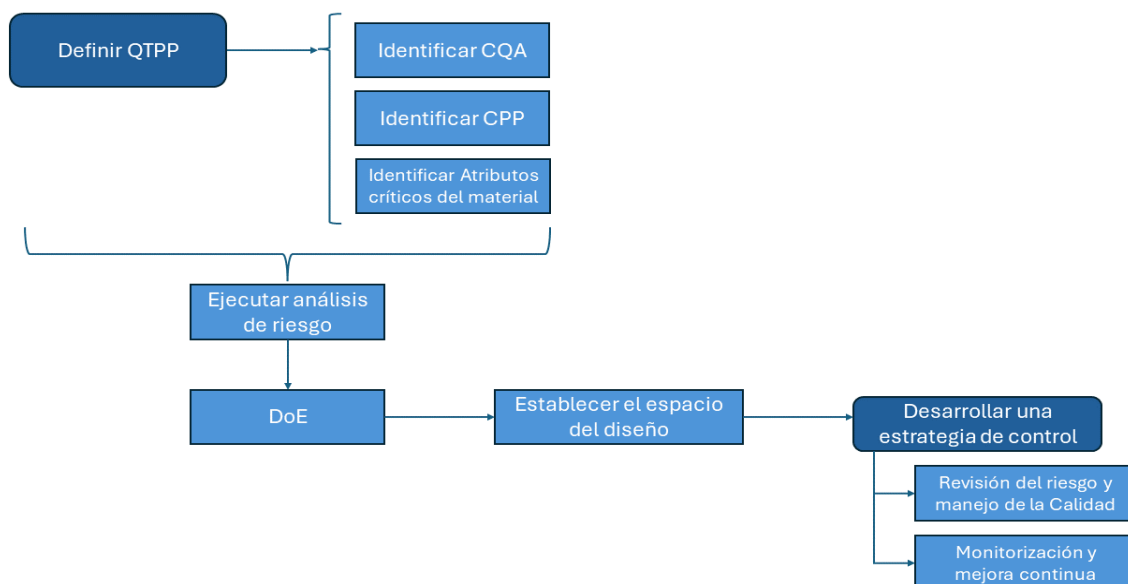


Figura 15: Pasos generales de la implementación de un enfoque por QbD en un desarrollo farmacéutico

La figura ilustra los pasos clave en la aplicación del enfoque QbD que comienza por la definición del QTPP seguido de la identificación de los CQA, los CMA, los CPP y los atributos críticos de material. Estos elementos juntos proporcionan la base necesaria para realizar el análisis de riesgo que, a su vez, es esencial para estructurar el DoE. Este enfoque sistemático guía la exploración del espacio del diseño. El conocimiento generado en esta fase facilita la configuración óptima de los CPP enfocada para el cumplimiento de los objetivos de calidad. De esta manera se establece una estrategia de control robusta, crucial para gestionar de manera continua el riesgo y asegurar la calidad del producto final. Modificado de (381).

Un concepto central en el enfoque QbD es el manejo de la incertidumbre y sus riesgos asociados (396). Particularmente, uno de los objetivos del QbD es desarrollar una base de conocimientos alrededor de la incertidumbre asociada a los riesgos del desarrollo (397). Mientras que el riesgo está relacionado con qué puede salir mal, la probabilidad de que ocurra y cuáles pueden ser los efectos de que ocurra (398), el análisis de riesgos o el manejo del riesgo corresponde al abordaje sistemático para eliminar o mitigar estos los riesgos. Este proceso incluye recabar información que apoye las decisiones relacionadas con los diferentes riesgos dentro del proceso de desarrollo (399). En la metodología QbD se busca que las actividades destinadas a aumentar el conocimiento de la interrelación entre las diferentes variables deban ser fundamentadas científicamente y basadas en un análisis detallado de los riesgos (400).

La implementación del QbD en los desarrollos de nanoformulaciones reviste de una importancia adicional, dado que existe una carencia de protocolos específicos para el desarrollo preclínico (381). Los desarrollos en esta área poseen un grado importante de incertidumbre asociada a su relativamente poca traslación clínica, comparada con otros tipos de sistemas de liberación de fármacos (401). El marco sistemático que ofrece el enfoque del QbD ofrece una alternativa para abordar esa incertidumbre y aumentar el éxito, la solidez de los desarrollos y su traslación clínica (384,402). Uno de los mayores retos asociados a la implementación del QbD en los desarrollos de nanotecnología es la identificación de los CQA. Como sistemas multidimensionales, las

formulaciones nanométricas requieren un mayor nivel de detalle en la definición de los CQA con un entendimiento específico de los fundamentos que determinan esa criticidad (377).

La integración del QbD en futuros desarrollos en el mundo de las nanopartículas promete reducir algunos de sus principales retos, incluyendo los obstáculos relacionados con el escalamiento (128,387). Los desafíos relacionados con el entendimiento de la interrelación entre CMA/CPP y CQA, y establecimiento mismo del QTPP aumentan a medida que los sistemas se vuelven más complejos. Esto resalta la importancia de la aproximación sistemática que el QbD brinda para los nuevos desarrollos de sistemas complejos de nanopartículas lipídicas, como aquellos que incluyen modificaciones superficiales. Estas consideraciones metodológicas facilitarían la obtención de resultados que sean sólidos, comparables, reproducibles y trasladables a aplicaciones clínicas (321).

1.2.8 Desafíos actuales para el avance clínico de las nanopartículas

Existe una considerable desproporción entre la investigación académica y la aplicación clínica en el campo de la nanomedicina. En el período comprendido entre 2018 y 2022 se publicaron más de 50.000 artículos sobre las aplicaciones de nanopartículas en biomedicina, mientras que la cantidad de productos aprobados para su uso clínico en ese mismo período fue de nueve (264).

Una de las principales barreras para el avance clínico de los nanomedicamentos es el elevado costo, que no solo afecta a la capacidad de producción, sino que también compromete la accesibilidad para los pacientes (280,281). Esta problemática se ilustra claramente en los altos precios de los medicamentos basados en nanopartículas para el silenciamiento y la edición génica. Por ejemplo, el costo anual de tratamiento de Onpattro® asciende a aproximadamente medio millón de dólares (403), mientras que el tratamiento con Casgevy® cuesta alrededor de 2,2 millones de dólares por paciente (404). Ante este panorama, la mejora y optimización de los procesos de desarrollo y manufactura pueden ser estrategias clave para reducir estos costos (405,406). De acuerdo con la visión de las empresas líderes en biotecnología incluidas en el estudio de Clogston y colaboradores, los principales retos están asociados con la facilidad de fabricación y escalado, los tiempos de desarrollo y la capacidad instalada, como se detalla en la Figura 16 (276).

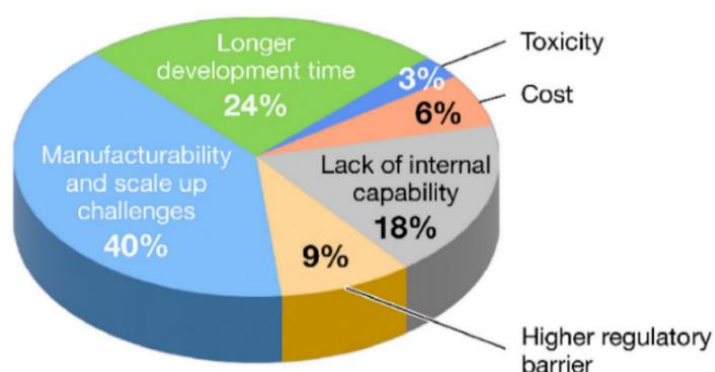


Figura 16: Principales obstáculos en el lanzamiento de productos farmacéuticos basados en la nanotecnología

Esta figura muestra los resultados obtenidos por Clogston y colaboradores, de acuerdo a los principales desafíos reportados por las compañías incluidas en su estudio respecto a los obstáculos para el desarrollo y lanzamiento de nuevos productos nanotecnológicos. Se destaca que los retos más significativos son la “manufacturabilidad” y el escalado con un 40%, seguido por los prolongados tiempos de desarrollo con un 24%. Otros obstáculos incluyen la falta de capacidad interna (18%), barreras regulatorias elevadas (9%), así como los costos (6%) y la toxicidad (3%).

Reproducida de (276).

Además de los desafíos técnicos relacionados con la manufactura, los retos traslacionales abarcan también aspectos de naturaleza compleja y multifactorial, los cuales requieren un

abordaje desde múltiples perspectivas para su resolución (407). La Figura 17 presenta un planteamiento detallado sobre cómo se pueden abordar estos desafíos, organizándolos en bloques estratégicos relacionados con el ciclo de vida del medicamento. Este análisis destaca la importancia de integrar eficazmente los avances tecnológicos con la creación de un marco regulatorio adecuado, aprovechando oportunidades estratégicas para replantear el paradigma en el diseño y desarrollo de nanopartículas. Los detalles de algunos de estos retos representativos serán desarrollados en subsecciones posteriores.

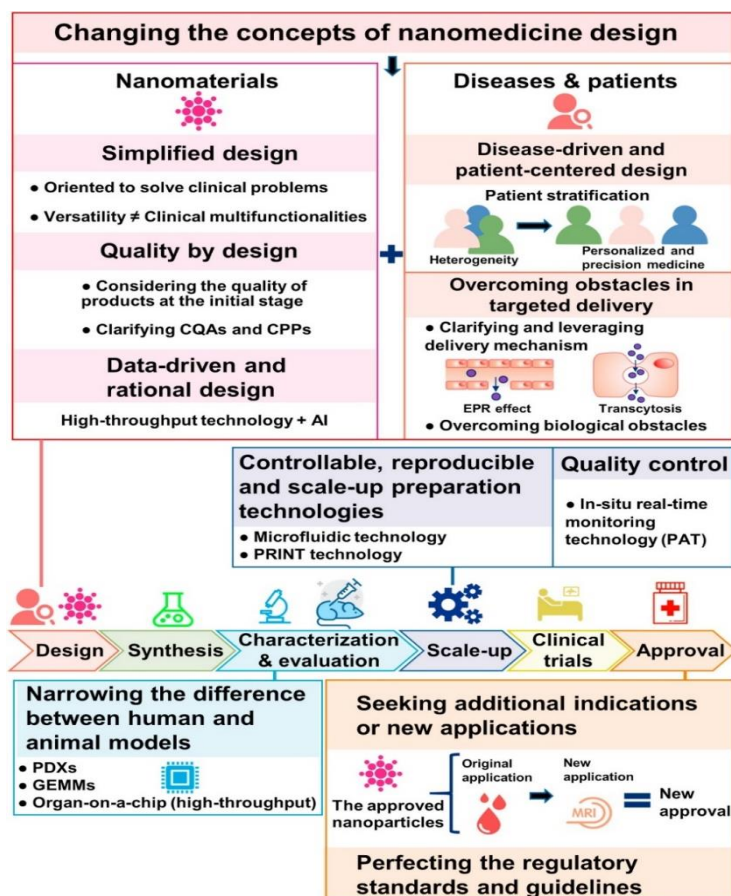


Figura 17: Perspectivas para afrontar los desafíos en la traslación clínica de la nanomedicina

La figura muestra el enfoque integral propuesto por Shan y colaboradores para mejorar el diseño y desarrollo de nanomedicinas, abordando desafíos clave en la traslación clínica. Se destacan áreas cruciales como la simplificación del diseño, la integración de los principios de Calidad por Diseño (QbD) y desarrollos dirigidos; desbloqueo del potencial para la medicina personalizada y el direccionamiento activo; la mejora en la escalabilidad y reproducibilidad de los procesos de manufactura; la mejora de la representatividad de los resultados de modelos preclínicos en comparación con lo observado en humanos; la exploración de nuevas indicaciones para medicamentos ya aprobados y el perfeccionamiento de los estándares regulatorios y guías internacionales.

Reproducida de (265).

1.2.8.1 Desafíos en la aprobación regulatoria

En el área específica de la aprobación regulatoria, algunos autores señalan que la regulación alrededor de las nanopartículas enfrenta desafíos debido a la falta de normativas claras y marcos regulatorios adecuados. A nivel global, los organismos reguladores como la FDA y la EMA aún trabajan bajo marcos tradicionales que podrían no ser suficientes para garantizar la calidad y seguridad de los nanomateriales. Sin embargo, un exceso de regulación puede retrasar la innovación y aumentar los costos de aprobación (227,408).

La cooperación internacional es esencial para establecer normas globales que regulen las nanopartículas en el ámbito biomédico, y permitan su fabricación conforme a las buenas

prácticas de manufactura (GMP, *Good manufacturing practices*). Además, se necesitan nuevas técnicas analíticas para evaluar sus propiedades físicas, junto con procedimientos estandarizados para garantizar su eficacia y seguridad (408).

La FDA sostiene que su marco regulatorio actual es lo suficientemente robusto y flexible para adaptarse a materiales de diferente índole, incluidos los nanomateriales. Estos materiales, por lo tanto, son evaluados bajo las guías regulatorias actuales (407). Sin embargo, esta agencia también reconoce la necesidad de reevaluar los sistemas de clasificación vigentes y desarrollar herramientas específicas para esta área. Entre las recomendaciones, se incluyen la colaboración estrecha entre la industria, la academia y organismos internacionales, el desarrollo de pruebas de evaluación toxicológica específicas y la mejora del conocimiento sobre la correlación entre las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento biológico *in vivo* (407).

1.2.8.2 Retos en la protección de la propiedad intelectual

Los retos relacionados con la propiedad intelectual se fundamentan en que, habitualmente, este tipo de desarrollos suelen implicar múltiples aspectos que podrían ser sujetos a protección: i) el fármaco encapsulado; ii) la tecnología del vehículo; y iii) las características combinadas del fármaco y el vehículo, además de las modificaciones adicionales al vehículo base. Esto plantea ciertos problemas con la concesión de patentes, especialmente cuando se combina algún componente novedoso dentro de ese paradigma, junto con algún elemento ya protegido. Esto puede requerir acuerdos de licencias cruzadas y múltiples patentes sobre una misma tecnología (408,409).

El problema puede agravarse por la acumulación indiscriminada de solicitudes de patentes que pueden retrasar la aprobación de nuevas innovaciones (práctica conocida como "*patent thickets*") y la emisión de patentes inválidas. La complejidad de la propiedad intelectual en los nanodesarrollos puede llevar a litigios costosos que retrasan la comercialización, por lo que se requieren normas y políticas globales que aborden específicamente este sector de la nanotecnología aplicada a la salud (408,410).

1.2.8.3 Retos relacionados con los modelos de predicción preclínica

Uno de los principales desafíos en el campo de la traslación clínica de la nanomedicina es la falta de modelos preclínicos que representen con precisión la heterogeneidad de las enfermedades humanas y su interrelación específica con sistemas de nanopartículas. Esta carencia genera, en muchas ocasiones, una desconexión entre los resultados obtenidos en estudios preclínicos y los resultados clínicos, afectando particularmente la evaluación preliminar de seguridad y eficacia de los tratamientos (411,412).

Se ha observado que los medicamentos basados en nanopartículas tienden a mostrar, comparados con fármacos convencionales, una menor predictibilidad de su comportamiento clínico en modelos de evaluación preclínicos. Esta variabilidad puede deberse a la influencia crítica que, sobre la eficacia de este tipo de sistemas, tienen aspectos como la farmacocinética, la distribución en los tejidos, la acumulación y penetración en el sitio objetivo, y la liberación del fármaco en dicho sitio (o incluso dentro de la célula objetivo) (413).

Además, aunque las nanopartículas lipídicas suelen ser bien toleradas, aún falta información sobre sus efectos en el organismo a largo plazo. La toxicidad crónica de estos materiales, tanto a nivel celular como sistémico, debe ser controlada cuidadosamente para asegurar que no existan efectos adversos a largo plazo. Esta toxicidad puede variar según el tamaño, la forma y

el material de las nanopartículas, lo que hace necesario el desarrollo de estrategias para abordar y minimizar estos riesgos (408,414).

1.2.8.4 Retos relacionados con la facilidad de fabricación a escala industrial

Un desafío significativo en la traslación clínica de los medicamentos basados en nanopartículas corresponde es la producción a gran escala, afectada por dificultades en la estandarización de procesos. Esto compromete la reproducibilidad y viabilidad económica de la producción industrial de nanopartículas. La complejidad de estos sistemas de liberación de fármacos, que suelen incluir múltiples componentes, presenta barreras técnicas y económicas que ralentizan el desarrollo de productos comercializables (279,407,415).

Problemas específicos incluyen deficiencia en el control de calidad en proceso, falta de equipo a escala industrial, dificultad de purificación, altos costos de producción, bajo rendimiento y falta de infraestructura o experiencia técnica, complicados adicionalmente por la falta de inversión económica (408).

Si bien es cierto que ya existen técnicas eficaces para la fabricación de grandes cantidades de materiales como los liposomas, las dificultades aumentan significativamente cuando los sistemas se vuelven más complejos. La incorporación de modificaciones superficiales, elementos de direccionamiento o la encapsulación de múltiples agentes terapéuticos requiere varios pasos de producción. Esto no solo encarece el proceso, sino que también dificulta los controles de calidad y afecta la estabilidad (408,415). Además, la inversión en instrumentación personalizada, equipos de manufactura e instalaciones puede ser prohibitivamente costosa para algunas empresas, o puede requerir estrategias de inversión escalonadas que dependan de la consecución de objetivos de desarrollo clínico incremental y que por lo tanto se prolonguen en el tiempo (415).

Los retos asociados con la producción industrial no solo son fundamentales por sí mismos, sino que también desempeñan un papel crucial en la superación de otros desafíos en la traslación clínica de las nanopartículas. Por ejemplo, la escalabilidad de los procesos de funcionalización es esencial para la viabilidad industrial de cualquier innovación que involucre la modificación de nanopartículas para mejorar el direccionamiento o modificar su biodistribución (416).

Además, el escalado de los procesos de manufactura en concordancia con las GMP es crucial para asegurar no solo la viabilidad técnica, sino también el cumplimiento de regulaciones que garanticen la calidad y seguridad de los medicamentos (360). Esta interdependencia resalta la necesidad de un enfoque multifactorial para abordar los retos en la producción industrial de nanomedicamentos.

1.2.8.5 Retos relacionados con la estabilidad a largo plazo

Existen desafíos significativos asociados con la estabilidad a largo plazo de las nanopartículas lipídicas, particularmente de las empleadas para transportar RNA (417). Estas preparaciones pueden experimentar una reducción de actividad en periodos cortos, que varían de semanas a meses. Actualmente, algunas de estas preparaciones requieren condiciones de almacenamiento y transporte en congelación para mantener su funcionalidad. Superar estos inconvenientes es esencial para reducir costos y complicaciones relacionadas con la gestión de la cadena de frío (417,418). Investigaciones sobre la liofilización han mostrado ser una posible solución para permitir el almacenamiento de estas nanopartículas a temperatura ambiente e incluso a temperaturas más elevadas, con retención de bioactividad (419,420).

1.2.8.6 Retos relacionados con la acumulación selectiva de las terapias

La acumulación selectiva de nanopartículas sigue siendo un desafío importante, ya que una considerable cantidad de nanopartículas suele acumularse de forma no controlada en órganos no deseados, lo que reduce su eficiencia terapéutica. La elucidación de los mecanismos de transporte puede guiar el desarrollo de medicamentos con una mayor eficiencia de acumulación en sitios específicos, lo que podría provocar una mayor traslación clínica (265).

La superficie de las nanopartículas puede ser modificada con ligandos que reconocen y se unen a receptores específicos, presentes en los tejidos diana, facilitando así su acumulación en sitios deseados (421,422). Detalles sobre las estrategias de modificación superficial se abordan con mayor profundidad en la sección 1.2.9.

Sin embargo, el alcance de la funcionalización para lograr el direccionamiento activo puede verse limitado porque algunos de estos receptores a los que se pueden dirigir las nanopartículas también están presentes en células “fuera de objetivo”, o incluso los ligandos adicionados pueden ser enmascarados por la corona proteica del plasma al entrar en la circulación sanguínea, enmascarando así los efectos de direccionamiento (265).

Además, factores como la composición, el tamaño y la forma de las nanopartículas base influyen también en cómo interactúan con el sistema biológico, incluyendo su circulación en la sangre, su acumulación en el sitio diana, y su capacidad para penetrar tejidos y células específicas (321,423).

El direccionamiento activo no solo depende del reconocimiento hacia sitios específicos, sino que también de superar otros desafíos como la estabilidad de las nanopartículas en el sistema circulatorio, su capacidad para evitar la respuesta inmunológica (424–426), o la capacidad para sobrepasar barreras biológicas, como lo puede ser la BHE (ver sección 0) (265). Además, también comprende el desarrollo de sistemas con la capacidad de responder a cambios microambientales o estímulos externos para liberar el principio activo de manera controlada (287,427). La complejidad en el abordaje de estos retos aumenta con la variabilidad entre pacientes y tipos de tejidos, lo que puede afectar la uniformidad y efectividad terapéutica (428).

Esta sección 1.2.8 ha mostrado algunos de los desafíos en la traslación clínica de las nanopartículas, ilustrando la complejidad y carácter multifactorial inherente a los retos en la traslación clínica de las nanopartículas. El abordaje de estos desafíos refuerza la importancia de considerar las interconexiones entre diferentes campos de estudio para avanzar de manera efectiva en la nanomedicina.

1.2.9 Funcionalización de nanopartículas lipídicas

La funcionalización corresponde a la modificación superficial de nanopartículas mediante la incorporación de agentes apropiadamente seleccionados que confieren características de interés específicas a la formulación (429). Habitualmente, este proceso tiene como objetivo dirigir las nanopartículas hacia objetivos moleculares sobre expresados en células o tejidos objetivo. Además, puede reducir la toxicidad de las nanopartículas, aumentar su estabilidad en fluidos biológicos o modificar su vida media en plasma sanguíneo (421,422).

Las nanopartículas se acumulan en tejidos específicos por dos mecanismos distintos: el direccionamiento pasivo y el direccionamiento activo (430,431). El direccionamiento pasivo es fruto de que las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, como el tamaño y la carga, facilitan la acumulación en ciertos tejidos a través del efecto de permeabilidad y retención

mejorada, o efecto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) (432,433). Este efecto se presenta especialmente en zonas donde la vascularización es más permeable, como en los tumores o áreas inflamadas (433). Sin embargo, este enfoque carece de especificidad, y podría no ser suficiente para prevenir la acumulación no selectiva en ciertos órganos como el hígado y el bazo, y posee una eficacia limitada en tejidos sanos o barreras como la BHE (422,434).

Por otro lado, el direccionamiento activo se logra al modificar la superficie de las nanopartículas con ligandos específicos que le permiten al sistema reconocer y unirse a receptores que están expresados en las células diana (421,431,435). Esta estrategia facilita un reconocimiento específico y mejora la acumulación del fármaco en el sitio de interés, lo que es particularmente útil en el caso de tejidos difíciles de alcanzar, como por ejemplo el cerebro (422,434). Así, el direccionamiento activo ofrece una mayor precisión terapéutica y es fundamental para superar algunas de las limitaciones observadas en el direccionamiento pasivo (421).

La funcionalización de las nanopartículas permite también modificar su biodistribución, aumentar la estabilidad de las nanopartículas en el torrente sanguíneo, y proteger el material encapsulado de la degradación (429). Además, las modificaciones superficiales pueden activar mecanismos biológicos específicos que mejoran la absorción celular y la liberación controlada del fármaco, así como facilitar mecanismos para la evasión de los sistemas inmunes, reduciendo la fagocitosis por macrófagos y prolongando el tiempo de circulación de las nanopartículas en el cuerpo (421,436).

Sin embargo, la modificación superficial de nanopartículas también presenta algunos desafíos significativos. Por ejemplo, la funcionalización de nanopartículas enfocada en el direccionamiento activo puede reducir la vida media en plasma en comparación con nanopartículas sin modificar. Esto puede deberse a la unión no específica o aumento de la inmunogenicidad. También se puede reducir su eficacia debido a una reducción de la penetración en tumores o al aumento de la susceptibilidad a degradación lisosomal (435). Desde la perspectiva de preparación, controlar la densidad superficial de ligandos y caracterizar de manera adecuada las nanopartículas funcionalizadas representan retos considerables. Además, la incorporación de un componente adicional, usualmente de naturaleza biológica, puede introducir una fuente adicional de inestabilidad en el sistema, comprometiendo la integridad y efectividad general de la formulación (327).

1.2.9.1 Agentes empleados para la funcionalización de nanopartículas

Entre los diversos agentes que se utilizan para funcionalizar las nanopartículas se incluyen anticuerpos, polisacáridos, proteínas, péptidos, aptámeros o *small molecules* (421,431,435). Los anticuerpos monoclonales son proteínas que muestran una alta estabilidad, especificidad y capacidad de unión a sus blancos moleculares. Aunque son ampliamente usados en terapias dirigidas, enfrentan limitaciones como altos costos de producción y el riesgo de provocar reacciones inmunes (421,434). Además, la inclusión de otros tipos de proteínas también puede facilitar el direccionamiento activo de nanopartículas mediante el reconocimiento de receptores específicos o alterando la corona proteica que se forma alrededor de las nanopartículas cuando son administradas (327,437). Esta última se define como la capa de biomoléculas que rodean la superficie de una nanopartícula tras la exposición a fluidos biológicos, representa la nueva identidad biológica de la nanopartícula y es la que determina su destino final *in vivo* (438).

Los aptámeros de oligonucleótidos son una clase de moléculas compuestas de DNA o RNA que adoptan conformaciones particulares que les permite unirse específicamente a sus blancos. Aunque su afinidad suele ser menor que la de los anticuerpos monoclonales, se han utilizado

para la funcionalización de nanopartículas puesto que son estructuras más económicas y más fácilmente modificables para aumentar su estabilidad o incorporar grupos funcionales adicionales (434). Los péptidos, por su parte, son pequeñas secuencias de aminoácidos que ofrecen características únicas que los posicionan entre las moléculas pequeñas y las proteínas. Como fragmentos de proteínas, tienen la capacidad de regular interacciones proteicas en sitios receptores específicos (111,439,440). Por su pequeño tamaño, los péptidos ofrecen ventajas como bajo costo de producción, buena estabilidad y facilidad de conjugación en alta densidad en la superficie de nanopartículas. A pesar de tener afinidades de direccionamiento típicamente menores que los oligonucleótidos y anticuerpos monoclonales, su versatilidad y economía han impulsado su uso creciente como agentes de direccionamiento para el transporte de nanopartículas (431,434). Otras estrategias de funcionalización incluyen folatos, carbohidratos y otras *small molecules* (434,437). La diversidad en las estrategias de funcionalización refleja los esfuerzos en investigación para optimizar la entrega de tratamientos de forma específica, buscando mejorar la distribución en el sitio deseado y reduciendo efectos secundarios (429).

1.2.9.2 Estrategias para la incorporación de agentes de funcionalización

La conjugación de agentes de funcionalización puede realizarse por dos vías principales, según sus características fisicoquímicas. Estas metodologías generales se ilustran en la Figura 18, donde se observa la inserción directa, antes de la fabricación de la nanopartícula, y la modificación de nanopartículas previamente preparadas. La estrategia de la fabricación de nanopartículas funcionalizadas en un solo paso (inserción directa) es aplicable para ligandos que tienen una alta estabilidad a los procesos de fabricación. Sin embargo, puede provocar que un importante porcentaje del ligando se oriente en el interior de la nanopartícula. Para mejorar el control sobre la orientación de los ligando, y especialmente cuando se utilizan sustancias costosas y frágiles frente a ciertos procesos de fabricación (como los anticuerpos), se recurre a la estrategia de inserción post-fabricación (327).

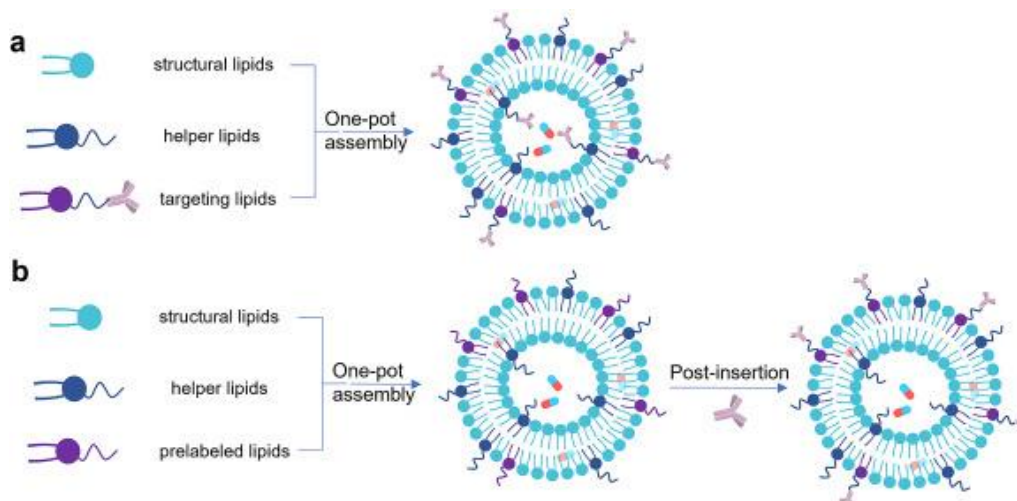


Figura 18: estrategias base para la incorporación de ligandos en nanopartículas lipídicas

La incorporación de agentes de funcionalización puede darse en una sola etapa, agregándolos antes de la fabricación de las nanopartículas (a), o insertarlos posterior a la obtención de estas (b). Reproducida de (327).

En ambos enfoques de funcionalización, es necesario que algunos de los materiales empleados para la fabricación de nanopartículas incorporen grupos funcionales con suficiente reactividad para los ligandos específicos a agregar. Estos grupos pueden reaccionar con los ligando antes de la fabricación, o pueden expresarse en la superficie de las nanopartículas para facilitar la

funcionalización posterior a la fabricación (421). El tipo de reacción incluye enlaces covalentes y enlaces no covalentes (429).

Las estrategias no covalentes incluyen interacciones débiles tales como interacciones electrostáticas, fuerzas de *van der Waals*, puentes de hidrógeno o interacciones adsorptivas. Son interacciones sencillas que no implican cambios estructurales importantes en las estructuras, pero como desventaja son fácilmente afectadas por variables como el pH o la fuerza iónica del medio (421). En contraste, en las reacciones covalentes se da la formación de un enlace químico estable entre la nanopartícula y la molécula funcional. Este tipo de enlace es más robusto y resistente a condiciones ambientales adversas. Entre las reacciones más comunes que generan enlaces covalentes en la funcionalización de nanopartículas se encuentran la reacción entre grupos maleimida y tioles (como en la cisteína), y las reacciones de acoplamiento con aminas o carboxilos activados (429,435).

El grupo funcional maleimida es ampliamente utilizado en la funcionalización de nanopartículas debido a su capacidad de formar enlaces de forma eficiente, selectiva y estables con grupos tiol (Figura 19) (327,441,442). Estos grupos pueden encontrarse naturalmente en residuos cisteína de diferentes ligandos como péptidos y proteínas, o pueden ser introducidos en diversos ligandos de interés (442,443). El empleo de este tipo de acoplamiento se beneficia de la disponibilidad comercial de lípidos y polímeros con grupos maleimida, que son aptos para la preparación de nanopartículas. Además, estas reacciones se enmarcan en lo que se conoce como química click (*click chemistry*) debido a su rapidez, eficacia y selectividad bajo condiciones suaves de reacción, facilitando la funcionalización de nanopartículas (221,443).

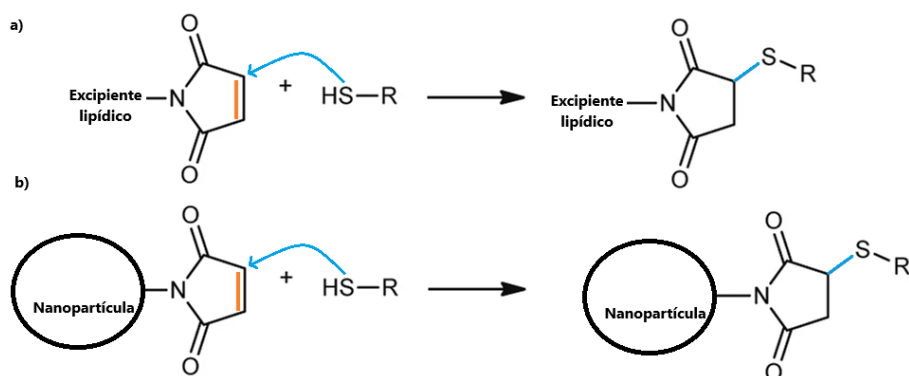


Figura 19: Reacción entre maleimida y grupos tiol

La reacción covalente entre el grupo SH (tiol) del agente de funcionalización provoca la formación de un enlace tioéter entre el agente de funcionalización y el componente lipídico (a) o la nanopartícula (b). Modificada de (441).

Otros reactivos que se utilizan comúnmente para la funcionalización de nanopartículas, especialmente para la conjugación de biomoléculas, son la N-hidroxisuccinimida (NHS) o carbodiimidas como el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Ambos reactivos permiten la activación de grupos carboxilo para facilitar su reacción con aminas y formar enlaces amida, particularmente para la conjugación de péptidos y proteínas (221,444,445).

La incorporación de cantidades apropiadas de agentes de funcionalización en nanopartículas puede enfrentar limitaciones relacionadas con el impedimento estérico o las interacciones electrostáticas, en función del tamaño y estructura del ligando (421). El uso de espaciadores moleculares, como el PEG, es esencial especialmente para mitigar el impedimento estérico cuando se utilizan ligandos de elevado peso molecular. Esto facilita una adecuada densidad de conjugación y asegura una separación adecuada entre los ligandos y la nanopartícula, lo cual podría mejorar la interacción con las moléculas diana (442,443).

Varios fenómenos adyacentes pueden considerarse con la funcionalización de nanopartículas. Estos incluyen posibles cambios en el tamaño de las nanopartículas que afectan su absorción, alteraciones en la estructura tridimensional de las moléculas activas durante la funcionalización, y la inestabilidad de la superficie causada por condiciones ambientales como el pH y la fuerza iónica (421). También debe considerarse si, en algunas ocasiones, los efectos observados tras la funcionalizar las nanopartículas se deben a la funcionalización misma, o a su efecto en la composición de la corona proteica (446–448).

La modificación de nanopartículas es uno de los principales eslabones en la expansión del potencial de la nanotecnología, ayudando a superar desafíos actuales en áreas como el direccionamiento activo, mejora de la compatibilidad y superación de barreras biológicas complejas (265). Por lo tanto, la aplicación de estas estrategias de modificación puede dar respuesta no solo a necesidades clínicas actuales sino abrir paso a la exploración de alternativas de difícil acceso mediante terapias innovadoras en el campo de la biomedicina.

1.2.10 Nanopartículas lipídicas como sistemas para cruzar la BHE

El uso de nanopartículas y, en particular, de nanopartículas lipídicas ha aumentado significativamente en la última década como estrategia no invasiva para cruzar la BHE, estableciéndose como una estrategia reconocida para mejorar la administración de terapias al cerebro (88,123,124,321,358,449). Como se señaló en la sección 1.1.6.2.7, esta implementación se debe principalmente al pequeño tamaño de las nanopartículas, su alta capacidad de transporte de fármacos, mayor biocompatibilidad, y un perfil de seguridad mejorado (38). Otras de las características ideales en nanopartículas para su administración hacia el SNC incluyen también una distribución uniforme del tamaño de las partículas, sin la formación de agregados, una carga superficial que minimice el aclaramiento y la capacidad de modificación superficial que mejore la tolerancia general y su direccionamiento a través de la BHE (93).

Las nanopartículas lipídicas son propensas a ser captadas por el cerebro, incluso sin ninguna funcionalización. Sin embargo, algunos autores argumentan que esta estrategia pasiva es difícil de controlar. Por lo tanto, el potencial del direccionamiento activo de las nanopartículas surge como una estrategia de administración más prometedora para atravesar la BHE (118,321,450,451).

Como se extrae de una revisión bibliográfica sistemática hecha en el marco de la presente tesis doctoral (Anexo 2-3) los péptidos, proteínas y anticuerpos se han destacado en los últimos años como las principales estrategias para modificar nanopartículas con el objetivo de atravesar la BHE (321). Estas modificaciones facilitan el transporte de las nanopartículas predominantemente a través del mecanismo de transcitosis mediada por receptores (452). Además, se han explorado otras estrategias de funcionalización como por ejemplo aptámeros (453), lípidos derivados de neurotransmisores (454), e incluso materiales como mentol (455) o derivados de tocoferol (456). También se observan estrategias combinadas como por ejemplo la combinación de péptidos con ácido fólico (457), anticuerpos con proteínas (458), aptámeros con péptidos (459) o combinación de péptidos con sistemas biomiméticos (460). Estos sistemas biomiméticos representan una estrategia adicional que favorece el cruce aprovechando el transporte mediado por células (sección 1.1.4.6). La Figura 20 muestra la distribución de las estrategias observadas en la revisión sistemáticas y que utilizadas entre 2016 y julio de 2024 para la funcionalización de nanopartículas, en estudios que evaluaron su efectividad como medio de vehiculización a través de la BHE, utilizando modelos *in vitro* o *in vivo*, de forma comparativa con nanopartículas sin funcionalizar (321).

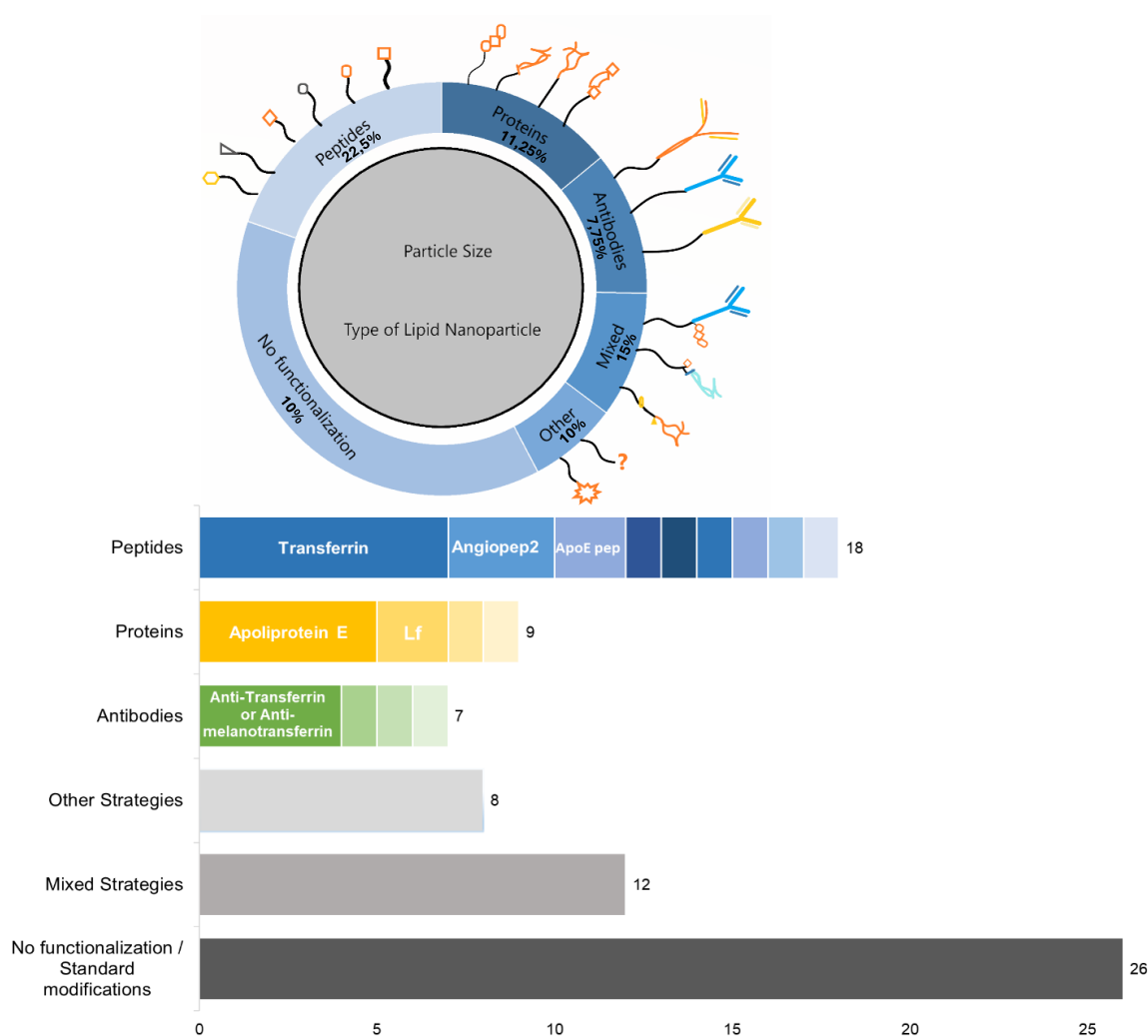


Figura 20: Estrategias de funcionalización en nanopartículas lipídicas para atravesar la BHE

La imagen ilustra las principales estrategias de funcionalización empleadas para potenciar el transporte de nanopartículas lipídicas a través de la BHE. Entre los péptidos, se destacan la Transferrina, Angiopep2 y péptido derivado de Apolipoproteína E; en la categoría de proteínas destacan la Apolipoproteína E y lactoferrina; mientras que los anticuerpos más utilizados son anti-transferrina o anti-melano transferrina. Imágenes modificadas de (321).

Una de las principales observaciones de la mencionada revisión sistemática es que los péptidos son la estrategia de funcionalización más ampliamente utilizada para mejorar la permeabilidad de las nanopartículas a través de la BHE. Como se mencionó en la sección 1.2.9.1, estas secuencias cortas de aminoácidos ofrecen la especificidad de las proteínas para unirse a receptores específicos, pero sin las limitaciones de inmunogenicidad y complejidad de producción que presentan las proteínas completas, entre otras características que fomentan su uso (440,450,461).

Los péptidos, como vectores de transporte (sección 1.1.6.2.5), representan una estrategia que puede facilitar el paso de *small molecules* hacia el sistema nervioso central, al aprovechar mecanismos de transporte específicos de la BHE (111). Este enfoque no es solo aplicable para *small molecules*, sino que también puede expandirse a la administración dirigida de macromoléculas y nanopartículas, mejorando así su permeabilidad (462)

El diseño de péptidos específicos que emulan mecanismos naturales de transporte puede inspirar el desarrollo de estrategias de funcionalización innovadoras para nanopartículas (111). Por ejemplo, algunos péptidos ampliamente utilizados para el transporte de diferentes tipos de

sustancias, y particularmente explorados como funcionalización de nanopartículas, son el Angiopep2, el péptido derivado de la glicoproteína del virus de la rabia (RVG), el péptido de direccionamiento al receptor de transferrina y el péptido de penetración celular (*cell penetrating peptide*), entre otros (462–466).

El Angiopep2 fue uno de los primeros péptidos evaluados como posibles vectores de transporte (464). Se emplea debido a su direccionamiento hacia la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) (463) involucrado en el transporte activo de lípidos y lipoproteínas, que es requerido para la homeostasis cerebral y para factores de señalización celular (467,468).

Por otra parte, el RVG es un péptido derivado de la glicoproteína presente en el virus de la rabia. Este virus presenta un notable neurotropismo, en el cuál la glicoproteína desempeña un rol determinante en el proceso de acceso del virus al sistema nervioso central y las células huésped (469,470). El mecanismo de acción de esta glicoproteína se basa en su alta afinidad por el receptor de acetilcolina, una característica que es conservada en el péptido específico de 29 aminoácidos. Este péptido mantiene una elevada afinidad por el receptor, y posee una estructura que se asemeja a algunas regiones específicas de proteínas neurotóxicas presentes en algunos venenos, conservando el neurotropismo sin presentar signos de neurotoxicidad (470). En 2007, el RVG se convirtió en el primer péptido con el que se pudo demostrar la entrega eficiente de ácido nucleicos modificados con el péptido hacia el SNC (462).

El receptor de transferrina se encuentra ampliamente expresado en diversos tejidos del cuerpo. Sin embargo, su aplicación más destacada en terapias dirigidas es como puerta de entrada al SNC (465). El THR es un péptido de 12 aminoácidos que interactúa específicamente con el receptor de transferrina humano y ha demostrado eficacia en facilitar el transporte de nanopartículas a través de la BHE. Sin embargo, presenta una baja estabilidad frente a proteasas en sangre. La versión retro-enantiómera de THR, conocida como THRre, muestra una mayor estabilidad en suero y una eficiencia superior de transporte. Este péptido se clasifica entre los llamados péptidos de tercera generación, que presentan una estructura ramificada y muestran una mayor estabilidad y capacidad de penetración a través de los modelos de BHE (462,464).

El desarrollo de sistemas de nanopartículas innovadores puede inspirarse en el estudio de otros péptidos que, aunque no han sido evaluados aún acoplados a nanopartículas, se han investigado como vectores de transporte y ligandos hacia receptores específicos (111,471,472). Un ejemplo de estos es el MiniAp-4, un péptido cíclico derivado de la apamina, una neurotoxina presente en el veneno de abeja. Este péptido ha sido optimizado para reducir su complejidad, toxicidad e inmunogenicidad, manteniendo su capacidad de direccionamiento cerebral, transporte activo y resistencia a proteasas, y que por lo tanto presenta un potencial no explorado para la administración segura y efectiva de nanopartículas para su direccionamiento hacia el cerebro (473).

El conjunto de los avances relacionados con las nanopartículas lipídicas y el impacto potenciador de las estrategias de funcionalización tienen el potencial de abrir nuevas posibilidades de acceso al SNC. A través de esta vía, las nanopartículas lipídicas ofrecen una plataforma versátil, capaz de no solo adaptarse a la liberación controlada de pequeñas moléculas, sino también de facilitar la administración de terapias más complejas y avanzadas. Estas nanopartículas mejoran la biodisponibilidad de compuestos terapéuticos que, de otro modo, tendrían dificultades para atravesar barreras fisiológicas como la BHE o para dirigirse a tejidos específicos. Tal es el caso de los ácidos nucleicos y las terapias basadas en silenciamiento génico que, al encontrar un

vehículo adecuado, podrían regular y modular la expresión génica en enfermedades neurodegenerativas y otros trastornos del sistema nervioso central (SNC).

1.2.11 Nanopartículas como vehículos para terapias de silenciamiento génico

El silenciamiento génico, como lo conocemos hoy en día, es el resultado de descubrimientos claves en la biología molecular que han moldeado la capacidad de observar, entender e incluso manipular la expresión de los genes de manera específica (474,475). Aunque la idea de inhibir la expresión de ciertos genes ya había sido explorada a lo largo del siglo XX, el descubrimiento de la interferencia mediada por RNA (RNAi) marcó un hito fundamental (476). En 1998, Andrew Fire y Craig Mello describieron el fenómeno del silenciamiento génico mediado por RNA de doble cadena en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, trabajo que les valió el Premio Nobel en 2006. Esta fue la primera demostración de cómo pequeñas moléculas de RNA podían interferir de manera específica con la expresión de genes específicos (274,477). Este descubrimiento abrió las puertas a nuevas formas de manipular la expresión génica y preparó el camino para el desarrollo de nuevas terapias basadas en siRNA con aplicaciones terapéuticas precisas (475,476,478).

El silenciamiento génico ofrece una oportunidad única para abordar los llamados "*undruggable targets*", aquellos genes o proteínas cuya inhibición no había sido posible mediante *small molecules* y terapias convencionales (479). Estas tecnologías no solo permiten un control terapéutico con alta especificidad, sino que abren posibilidades para intervenir en procesos biológicos que previamente eran inalcanzables. Gracias a la especificidad del siRNA y otros RNA interferentes, es posible modular la expresión de genes involucrados en ciertas patologías complejas, lo que podría permitir abordar enfermedades que hasta ahora carecen de tratamientos efectivos, como ciertos tipos de cáncer, enfermedades raras o patologías neurodegenerativas (476,478). A medida que avanzan las plataformas de administración de siRNA, especialmente las nanopartículas lipídicas, el futuro del silenciamiento génico se perfila como una herramienta potente para ampliar el rango de condiciones patológicas que pueden ser tratadas (475).

1.2.11.1 Principios del silenciamiento génico mediado por siRNA

La transcripción es el proceso por el cual un gen se expresa y la información que contiene, a manera de plantilla, permite la síntesis de proteínas en el ribosoma (480,481). Este proceso se inicia con la conversión de una secuencia específica de DNA en RNA mensajero (mRNA), con la participación de otros tipos de RNA que contribuyen a la precisión y regulación de la expresión génica. En el núcleo celular, el DNA se desenrolla, permitiendo que la RNA polimerasa transcriba la información en una molécula de mRNA. Esta secuencia de mRNA es posteriormente traducida en el citoplasma para producir proteínas específicas, que ejecutan las funciones celulares necesarias para el crecimiento, la reparación y la regulación de los tejidos (482,483).

El silenciamiento génico o interferencia mediada por RNA (iRNA) es un proceso que permite el bloqueo de la expresión génica a nivel post-transcripcional (484). El siRNA es un tipo de ácido ribonucleico pequeño de doble cadena, con una extensión típicamente entre 20 y 25 nucleótidos. Una vez dentro de la célula, el siRNA se integra en el complejo enzimático de silenciamiento RISC (*RNA-induced silencing complex*), que separa las dos hebras de RNA y utiliza una de ellas como guía para emparejarse con el mRNA específico que se desea silenciar, a la cual es complementaria. Consecuentemente, esto promueve la degradación del mRNA interrumpiendo así el flujo de información y bloqueando la síntesis de la proteína correspondiente, como se ilustra en la Figura 21 (474,477,485).

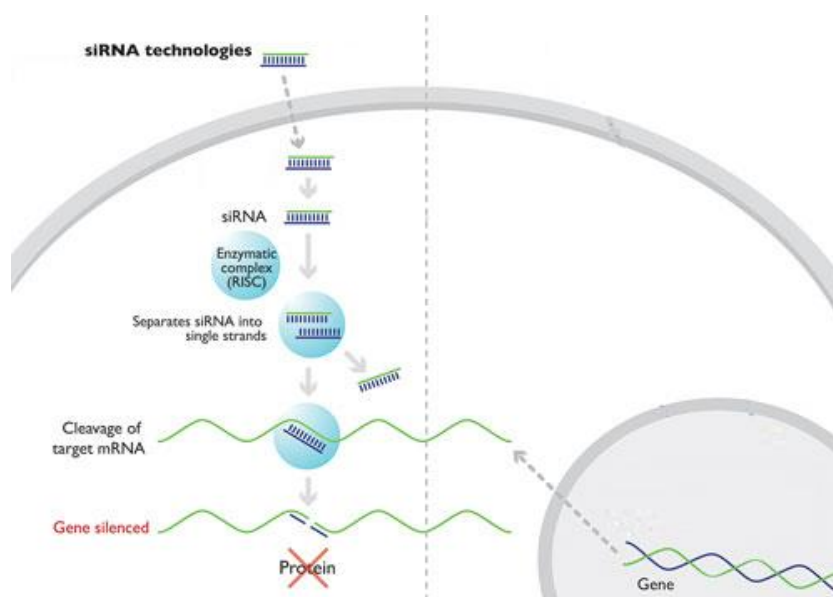


Figura 21: Mecanismo de acción del siRNA

El principio del silenciamiento génico mediado por siRNA es el apareamiento de la secuencia del siRNA con el mRNA específico al que es complementario, bloqueando la traducción de ese mRNA y por lo tanto la síntesis de la proteína correspondiente. Imagen modificada de (486).

En la fisiología natural, los siRNA endógenos ayudan a mantener la integridad genómica al prevenir la acción de ácidos nucleicos disruptivos, incluyendo aquellos que provienen de virus, transposomas o retrotransposomas (255,487). Su aplicación terapéutica, mediante el diseño de secuencias complementarias dirigidas a secuencias de proteínas aberrantes previamente identificadas por su rol determinante en ciertas enfermedades, representa una herramienta importante para abordar algunas enfermedades congénitas, infecciones virales y ciertos tipos de cáncer, así como una estrategia prometedora para la medicina personalizada (208,209,375,479,488–491).

Los siRNA forman parte de una familia más amplia de moléculas de RNA de interferencia que incluyen otros tipos de RNA pequeños como los microRNA (miRNA) y los RNA de interferencia piwi (piRNA) (475,489). Todos estos tipos de RNA actúan bloqueando la traducción de mRNA con sus propias particularidades de mecanismo y función biológica (492–494). El Premio Nobel de Medicina 2024 fue otorgado a Victor Ambros y Gary Ruvkun por su descubrimiento de los microRNA y su papel esencial en la regulación génica post-transcripcional, lo que resalta la significancia de estos procesos en la biología y la medicina moderna (495).

Otro enfoque que permite el silenciamiento génico post-transcripcional es el uso de oligonucleótidos antisentido (ASO), que se diferencian de los siRNA en varios aspectos clave. A diferencia de los siRNA, los ASO son cadenas sencillas de DNA o RNA modificado que se unen directamente al mRNA sin necesidad del complejo RISC, promoviendo la degradación del mRNA o bloqueando su traducción (496). Además, los ASO pueden actuar tanto en el citoplasma como dentro del núcleo de la célula, lo que les permite interferir en etapas tempranas de la expresión génica en comparación con los siRNA, que actúan únicamente en el citoplasma (497). Los ASO ofrecen una flexibilidad adicional en cuanto a la selección de objetivos terapéuticos, ya que pueden diseñarse sin las estrictas restricciones de complementariedad de bases que requiere el siRNA. Sin embargo, esta menor especificidad en los ASO puede aumentar el riesgo de efectos *off target*, lo que podría resultar en la inhibición no deseada de la expresión de otros genes. Por otro lado, el siRNA generan una degradación más rápida y eficiente del mRNA objetivo, gracias a la actividad enzimática del complejo RISC (498,499).

La elección entre el uso de ASO y siRNA en el desarrollo terapéutico depende no solo de las características propias de cada enfoque, sino también de las particularidades del gen o patología a tratar. Este balance, ha ampliado el horizonte biomédico en la última década, permitiendo modular la expresión génica con fines terapéuticos no solo en el campo de la investigación, sino dando el salto al mercado farmacéutico (500,501).

1.2.11.2 Historia de la aplicación terapéutica del silenciamiento génico

Desde el descubrimiento del RNAi, el campo de las terapias basadas en silenciamiento génico ha evolucionado de manera significativa, logrando la modulación de la expresión génica de manera cada vez más precisa y efectiva (476,478). La Figura 22 muestra una línea de tiempo con la aprobación regulatoria de medicamentos basados en silenciamiento génico, ilustrando la evolución en los desarrollos novedosos para tratar enfermedades que previamente eran difíciles de difícil abordaje.

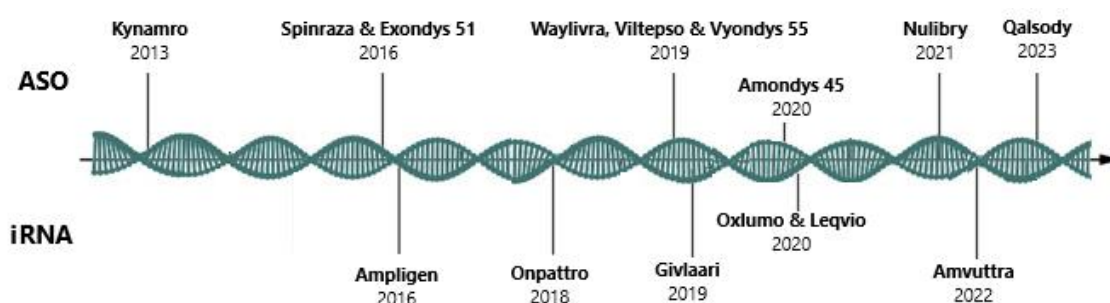


Figura 22: Línea de tiempo de los lanzamientos de productos basados en silenciamiento génico

Incluye medicamentos que inhiben la expresión génica mediante oligonucleótidos antisentido (ASO, parte superior) y estrategias basadas en RNA de interferencia (siRNA, parte inferior). Imagen modificada de (499).

Los medicamentos aprobados que emplean silenciamiento génico incluyen la hipercolesterolemia familiar homocigótica (Kynamro®, mipomersen sódico, Ionis Pharmaceuticals), la atrofia muscular espinal (Spinraza®, nusinersen, Ionis Pharmaceuticals), el síndrome de fatiga crónica (Ampligen®, rintatolimod, AIM ImmunoTech), la hipertrigliceridemia y la deficiencia de lipoproteína lipasa (Waylivra®, volanesorsen, Ionis Pharmaceuticals), la porfiria (Givlaari®, givosirán, Alnylam), la hiperoxaluria (Oxlumo®, lumasirán, Alnylam), la aterosclerosis y la hipercolesterolemia familiar heterocigótica (Leqvio®, inclisirán, Alnylam), la deficiencia del cofactor de molibdeno (Nulibry®, fosdenopterin, Orphatec), y la esclerosis lateral amiotrófica (Qalsody®, tofersen, Ionis Pharmaceuticals) (501,502).

Además, para la amiloidosis hereditaria relacionada con transtirretina se aprobaron los medicamentos Tegsedi® (inotersén, Ionis Pharmaceuticals), Onpattro® (patisirán, Alnylam), y Amvuttra® (vutrisirán, Alnylam). En el caso de la distrofia muscular de Duchenne, los medicamentos de silenciamiento génico disponibles son Exondys 51® (eteplirsén, Sarepta Therapeutics), Viltepso® (viltolarsén, Nippon Shinyaku), Vyondys 53® (golodirsén, Sarepta Therapeutics) y Amondys 45® (casimersén, Sarepta Therapeutics) (501,502).

La aprobación en 2018 del Onpattro por parte de la FDA significó un hito importante por ser el primer medicamento de silenciamiento génico en el que la vehiculización del siRNA se realiza mediante nanopartículas lipídicas (488,501). Este avance representó un cambio de paradigma tanto en el ámbito de la nanotecnología como en el de desarrollo de terapias génicas y terapias con RNA. Las terapias basadas en siRNA representan aproximadamente el 30% de los desarrollos relacionados con RNA dentro de la cartera del mercado biofarmacéutico, mientras que el resto se distribuye en 37% en mRNA, 21% ASO y 12% otros tipos de oligonucleótidos no codificantes.

Hacia finales del año 2023, los desarrollos basados en iRNA comprendían alrededor de 750 estudios en fases preclínicas y más de 150 en fases de estudios clínicos (502). Este impulso en el área también repercute en un incremento sustancial en la solicitud de patentes relacionadas con el silenciamiento génico, así como un aumento en la inversión y creación de nuevas dedicadas a proyectos innovadores en el área del desarrollo terapéutico de estas tecnologías (489).

El silenciamiento génico emerge no solo como una herramienta prometedora para el tratamiento de enfermedades raras, sino que también abre nuevas oportunidades en afecciones más comunes (501,502). Esta tecnología se expande más allá de las enfermedades congénitas hacia la oncología, las enfermedades infecciosas y crónicas, siendo aplicable en cualquier condición donde la regulación precisa de genes previamente identificados pueda cambiar el curso de la enfermedad (208,209,489,504–506).

1.2.11.3 Silenciamiento génico como estrategia terapéutica en el SNC

Muchas enfermedades neurológicas no responden a los tratamientos con *small molecules* y no disponen de una terapia eficaz a largo plazo. El silenciamiento génico promete ser una plataforma para el tratamiento tanto de enfermedades cerebrales genéticas como para las adquiridas, interviniendo específicamente en genes patológicos implicados en la síntesis de proteínas asociadas al progreso de la enfermedad (507).

Varios factores hacen que algunos trastornos del SNC sean candidatos atractivos para la intervención terapéutica mediante siRNA (508). En algunas enfermedades congénitas, como la enfermedad de Huntington o la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X, la terapia génica representa una opción prometedora para trastornos causados por mutaciones genéticas específicas. En estos casos, el silenciamiento del gen defectuoso podría bloquear la expresión de proteínas anómalas o reducir la acumulación de metabolitos tóxicos, deteniendo o ralentizando así la progresión de la enfermedad (507,508).

El silenciamiento génico también es una estrategia atractiva en el caso de ciertas enfermedades neurodegenerativas. Alrededor de un 20% de los casos de esclerosis lateral amiotrófica son causados por una mutación heredada en el gen que codifica a la enzima superóxido dismutasa 1. El silenciamiento de este gen mutado se ha demostrado como estrategia para el tratamiento de la enfermedad en modelos *in vitro* (508). En la enfermedad de Parkinson, muchos estudios apuntan al silenciamiento del gen de la α -sinucleína como estrategia terapéutica, debido a su rol crítico en la función neural y a numerosos estudios que señalan que mutaciones en dicho gen están relacionadas estrechamente con la patología de esta enfermedad, entre otros genes (504).

Otro ejemplo lo constituye la enfermedad de Alzheimer, en la que se han identificado numerosas mutaciones en diversos genes asociados con el desarrollo de la neuropatía. Por ejemplo, se ha demostrado que la acumulación de proteína β -amiloide es superior cuando se dan mutaciones en los genes que codifican la presenilina 1, presenilina 2 o el gen APP, además de otros genes involucrados en la síntesis de enzimas implicadas en el anclaje de la proteína β -amiloide, como los genes de β -secretasas y γ -secretasas. En total, más de 20 secuencias han sido identificadas como posibles objetivos terapéuticos para el silenciamiento debido a su rol en la progresión de la enfermedad de Alzheimer (508,511).

Además de los trastornos neurodegenerativos y enfermedades congénitas, el silenciamiento génico también muestra potencial en el tratamiento de trastornos psiquiátricos (512–516) y tumores cerebrales (507,517,518). En trastornos psiquiátricos como la depresión y la ansiedad,

se ha investigado el desarrollo de estrategias terapéuticas mediante la regulación de la expresión de ciertas citocinas proinflamatorias (513) y el silenciamiento de isoformas específicas de neurotransmisores cuya desregulación forma parte de la fisiopatología de estos trastornos (514,515). Por otra parte, las estrategias de silenciamiento investigadas para el tratamiento de tumores cerebrales incluyen la inhibición de transportadores asociados a la resistencia a múltiples fármacos, como las proteínas MRP (*multidrug resistance related proteins*), codificadas por diferentes genes y sobreexpresadas en ciertos tipos de tumores. Asimismo, se ha explorado la inhibición de bombas de eflujo, responsables de la expulsión de medicamentos fuera de la BHE, como una forma de mejorar el efecto de otros medicamentos (517). También se ha abordado, como posible estrategia terapéutica, el silenciamiento de oncogenes específicos sobre expresados en distintas isoformas de glioblastoma como el miR-21, el MYCN o el CCND1 (519). Otras estrategias incluyen el silenciamiento de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (520) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (521), o la inhibición de la angiogénesis mediante el silenciamiento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (522). Además, existen otras estrategias de silenciamiento que pueden afectar las vías de señalización tumorales o modular del microambiente tumoral para frenar la progresión del cáncer (523–525).

Muchas de estas enfermedades del SNC actualmente solo pueden tratarse mediante el abordaje de sus síntomas. Ante este panorama, los medicamentos basados en el silenciamiento génico representan una alternativa esperanzadora para los sistemas de salud (511). No obstante, gran parte de este potencial sigue limitado a los laboratorios de investigación, con una expansión aún limitada hacia la práctica clínica (504).

Uno de los mayores retos del silenciamiento génico en el SNC es la entrega eficiente de siRNA a las células diana (508,526). La ruta intramuscular o intravenosa para la administración de medicamentos que contengan siRNA es preferible debido a la comodidad del paciente y balance costo/beneficio. Sin embargo, para lograr su objetivo el siRNA deben superar diferentes barreras intra y extracelulares (511). El principal reto asociado a la administración sistémica de siRNA es la rápida degradación, ya que las moléculas de siRNA administradas sin ningún vector son susceptibles a la acción de nucleasas presentes en el plasma y en los tejidos, además de ser rápidamente excretadas por vía renal o fagocitadas por macrófagos, lo cual limita su capacidad de alcanzar el tejido objetivo (527,528). En el caso específico de las terapias dirigidas hacia el SNC, la aplicación de siRNA enfrenta un reto adicional: la BHE, que como ya se mencionó en la sección 1.1.5, impide el paso de biomoléculas, dificultando el paso de siRNA hacia el cerebro (502,509,515).

Debido a estos retos y particularidades fisiológicas, el desarrollo de sistemas adecuados de entrega de siRNA que proporcionen protección, direccionamiento preciso y, especialmente, la capacidad de superar el obstáculo que impone la BHE, se convierte en uno de los eslabones fundamentales para desbloquear el potencial del silenciamiento génico en el manejo de los trastornos del SNC.

1.2.11.4 Nanopartículas lipídicas como vehículos de entrega para siRNA

El amplio potencial del silenciamiento génico radica en que, teóricamente, cualquier gen causante de una enfermedad puede ser seleccionado como diana terapéutica. Sin embargo, el uso de siRNA sin modificar enfrenta retos significativos, principalmente debido a su limitada biodisponibilidad tras la administración sistémica y a su dificultad inherente para atravesar membranas y barreras fisiológicas (529). Por lo tanto, la traducción clínica de terapias basadas

en siRNA ha dependido en gran medida de modificaciones específicas que mejoren su estabilidad y eficacia (317,530). Las nanopartículas lipídicas se han consolidado como sistemas de entrega de biofármacos, con varios medicamentos aprobados. Además, se espera que en un futuro cercano se aprueben más terapias basadas en siRNA encapsuladas en nanopartículas, orientadas a distintos tejidos y patologías (528,531).

La importancia de estos sistemas como vehículos para moléculas de RNA radica en su capacidad de protección y estabilización (529). Esto se logra a través de la formación de un complejo electrostático entre el ácido nucleico y el lípido ionizable, que encapsula el siRNA dentro de la matriz lipídica, asilándolo del entorno, estabilizándolo y protegiéndolo eficazmente de la hidrólisis, la degradación ambiental y la acción de nucleasas (339,532). La eficacia del lípido ionizable para proteger el siRNA y asegurar su liberación -aspectos claves para lograr un efecto terapéutico eficaz- radica en su dualidad en términos de la modulación de su constante de disociación ácida (pK_a). En medios con un pH inferior al pK_a del lípido ionizable (los que se buscan, por ejemplo, durante la preparación de las nanopartículas), el grupo amino presente en estos lípidos se protona, permitiendo su interacción con los ácidos nucleicos cargados negativamente y facilitando el ensamblaje de los componentes en nanopartículas que encapsulan el siRNA. En entornos fisiológicos, donde el pH es superior a la pK_a , la superficie de la nanopartícula lipídica adquiere una carga casi neutra, lo cual optimiza su circulación en el organismo y minimiza la toxicidad. Posteriormente, al ingresar en las células objetivo y encontrarse en el ambiente ácido de los endosomas, el grupo amino vuelve a cargarse positivamente provocando repulsión de las moléculas internas de la nanopartículas, que se asocian a lípidos aniónicos endosomales. Esto provoca la desestabilización tanto de la nanopartícula como de la membrana endosomal, promoviendo el escape y liberación del siRNA hacia el citoplasma (528,531,533,534). Este mecanismo de escape se ilustra en la Figura 23.

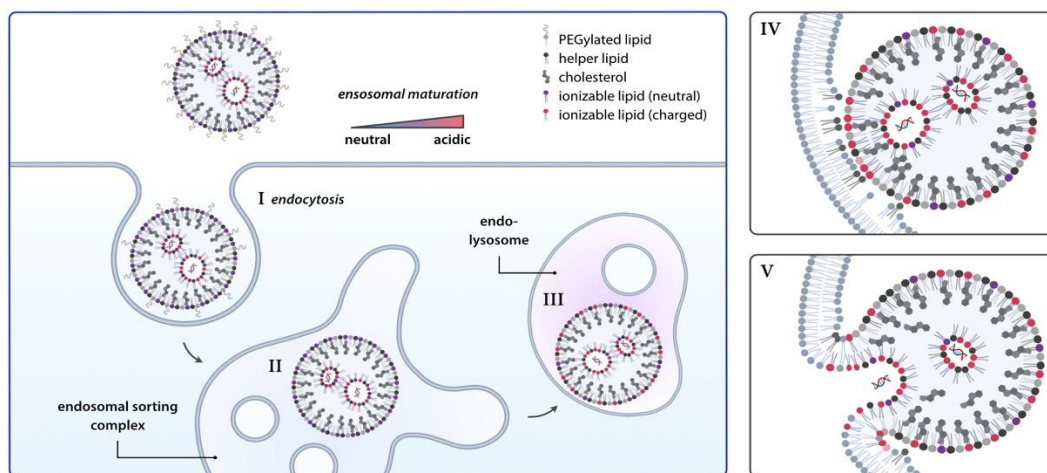


Figura 23: Escape endosomal de nanopartículas de lípido ionizable.

Luego de la endocitosis, el ambiente endosomal se acidifica progresivamente. En esas condiciones, el lípido ionizable se protona, lo que desestabiliza la membrana endosomal mediante su interacción con los lípidos aniónicos presentes en dicha membrana. Esto facilita la fusión con dicha membrana y permite la liberación del siRNA al citoplasma. Imagen reproducida de (535).

La encapsulación del siRNA en nanopartículas lipídicas no solo facilita la estabilización y protección de estas moléculas frente a las condiciones del entorno fisiológico, sino que permite mejorar su biodisponibilidad y precisión en el direccionamiento (327,430). Explotar estas características resulta especialmente prometedor al considerar la administración sistemática para el tratamiento de trastornos del SNC (321,536). La versatilidad de las nanopartículas lipídicas, junto con los avances en funcionalización y optimización de la administración,

posicionan a estas plataformas como elementos clave para desbloquear tratamientos innovadores en el campo de la neurofarmacología.

Dadas las complejidades fisiológicas de la BHE (secciones 1.1.3 y 1.1.4) y su papel como barrera para las terapias dirigidas al SNC (sección 1.1.5), el desarrollo de tratamientos eficaces para enfermedades del SNC exige estrategias de administración innovadoras. La BHE limita significativamente la entrada de biomoléculas, incluidas las terapias génicas basadas en siRNA (43), y obliga a diseñar métodos de entrega que aprovechen sus mecanismos habituales de transporte (sección 1.1.6), como la transcitosis mediada por receptores y el uso de transportadores específicos (63). Estos enfoques no invasivos han demostrado una mayor viabilidad y son clave en la innovación de sistemas de administración avanzados que no comprometan la integridad de la BHE.

La nanotecnología (sección 1.2) juega un rol fundamental al ofrecer plataformas que permiten superar barreras biológicas como la BHE. Los avances en la creación y optimización de nanopartículas lipídicas (secciones 1.2.4 y 1.2.5) brindan oportunidades para encapsular y proteger biomoléculas vulnerables, como el siRNA. De esta manera se puede facilitar su entrega a sitios de acción específicos, particularmente aprovechando las ventajas que se obtienen con la funcionalización de nanopartículas lipídicas (sección 1.2.9), que permite adaptar estos sistemas para dirigirse a receptores específicos. Estas posibilidades de personalización han demostrado ser cruciales para mejorar la especificidad y biodisponibilidad de las terapias, e impulsar el desarrollo clínico de terapias avanzadas, como aquellas terapias que se basan en el silenciamiento génico (sección 1.2.11).

La integración de la nanotecnología en la neurofarmacología representa una confluencia crucial de innovación, que ofrece nuevas herramientas terapéuticas para enfermedades del SNC que hasta ahora carecen de tratamientos efectivos. Desde una comprensión detallada de la BHE hasta el desarrollo de estrategias avanzadas de vehiculización y funcionalización, se construye un camino de innovación que amplía los límites de la biomedicina. Aunque persisten desafíos para llevar estas líneas de investigación a la práctica clínica, el desarrollo de formulaciones que no solo sean efectivas, sino también seguras, escalables a nivel industrial y accesibles a la población general, es fundamental para transformar conceptos teóricos en aplicaciones clínicas tangibles. Abordar estos retos desde una perspectiva integradora y con una visión de industrialización tiene el potencial de reducir los tiempos y costos de los desarrollos de nanopartículas. De esta manera, se podría encontrar la llave para desbloquear las puertas del cerebro y aprovechar todo el potencial de las nanopartículas lipídicas en el tratamiento de una amplia gama de trastornos neurológicos y psiquiátricos, y revolucionar el tratamiento de las enfermedades del SNC.

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal

El objetivo principal de esta investigación es desarrollar y evaluar un sistema farmacéutico basado en nanopartículas lipídicas que permita la encapsulación, protección y direccionamiento de siRNA para ser administrado hacia dianas terapéuticas dentro del SNC, a través de la BHE, empleando principios de QbD para garantizar la calidad, eficacia y seguridad del sistema desarrollado, desde un enfoque que facilite su aplicación y replicación a escala industrial.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Desarrollar una formulación base de nanopartículas para encapsular siRNA con potencial de funcionalización

2.2.1.1 Aplicar en enfoque de QbD para definir un QTPP para el desarrollo de una forma farmacéutica destinada a vehiculizar siRNA a través de la BHE.

2.2.1.2 Explorar las alternativas de vehículos, composiciones y métodos de fabricación que faciliten la encapsulación efectiva de siRNA, asegurando su compatibilidad con el silenciamiento génico.

2.2.1.3 Establecer una formulación base de nanopartículas lipídicas definiendo técnicas de fabricación, tipo de vehículo, composición cualitativa y cuantitativa, y condiciones de manufactura específicas., fundamentadas en los estudios de optimización y evaluación de riesgos previos.

2.2.1.4 Desarrollar un entendimiento profundo de cómo los parámetros de formulación y del proceso afectan las características críticas de calidad (CQA) de las nanopartículas, aplicando el enfoque de QbD para optimizar el proceso de fabricación y asegurar la reproducibilidad y escalabilidad del sistema.

2.2.1.5 Realizar una caracterización de los CQA priorizada por riesgo e identificar las condiciones de almacenamiento que proporcionen estabilidad apropiada para las primeras fases de evaluación preclínica.

2.2.2 Funcionalizar las nanopartículas lipídicas para mejorar la penetración a través de la BHE mediante la adhesión de péptidos de superficie.

2.2.2.1 Evaluar y optimizar la incorporación de maleimida para maximizar la expresión de grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas para facilitar la adhesión efectiva de péptidos.

2.2.2.2 Establecer las condiciones óptimas de funcionalización, que incluyan el proceso de incubación y la selección y proporción de péptidos, para lograr una modificación

eficiente de la superficie de las nanopartículas que potencie su permeabilidad a través de la BHE.

2.2.3 Evaluar la eficacia biológica de las nanopartículas desarrolladas como vehículos para terapias de silenciamiento génico dirigidas al SNC

2.2.3.1 Demostrar la biocompatibilidad y la capacidad de penetración celular de las nanopartículas en modelos celulares *in vitro*.

2.2.3.2 Realizar ensayos de silenciamiento génico en modelos celulares *in vitro* para estudiar la funcionalidad de las nanopartículas para transportar y liberar siRNA de forma efectiva para la inducción de un silenciamiento génico específico.

2.2.3.3 Evaluar la biodistribución en modelos *in vivo* para determinar cómo la funcionalización con distintos péptidos afecta a la acumulación de nanopartículas en el SNC.

3. Materiales y métodos

Alineados con los objetivos de esta investigación, se detallan los materiales, equipos y técnicas empleados. Estos se organizan en cuatro bloques principales de trabajo: un primer bloque relativo al desarrollo de las nanopartículas “base”, un segundo con su posterior funcionalización, un tercer bloque de caracterización de atributos de calidad y por último un bloque de evaluación del desempeño biológico de las nanopartículas lipídicas funcionalizadas. Por último, se incluye un apartado con consideraciones adicionales, donde se exponen detalles sobre las configuraciones experimentales específicas, el abordaje estadístico y aspectos éticos y de seguridad.

3.1 Materiales y equipos

3.1.1 Materiales

Esta sección detalla los distintos materiales y equipos empleados en la fabricación, funcionalización y evaluación de las nanopartículas lipídicas desarrolladas. De la Tabla 2 a la Tabla 5 presentan los diferentes materiales utilizados en la fabricación de las nanopartículas. Por otra parte, de la Tabla 6 a la Tabla 10 se incluyen los diferentes materiales requeridos para las diferentes pruebas de caracterización fisicoquímica y biológica de las nanopartículas.

Tabla 2: Excipientes utilizados para la fabricación de las nanopartículas lipídicas

Material ¹	Función en la formulación	Proveedor	Números de Lote
DOTAP	Lípido catiónico/ionizable	Nanosoft polymers	25396 2539606
DLin-MC3-DMA	Lípido catiónico/ionizable	Nanosoft polymers	2532506
DOTMA	Lípido catiónico/ionizable	Nanosoft polymers	2533504
DSPC	Fosfolípido (<i>helper lipid</i>)	Sigma Aldrich	5653PNB160 5653PQB173
DOPE	Fosfolípido (<i>helper lipid</i>)	Avanti lipids	5736PNB433
Colesterol	Lípido estructural	Sigma Aldrich	SLCG0969
DOPE-mPEG2000	Lípido Pegilado	Nanosoft polymers	134610203
DSPE-mPEG2000	Lípido Pegilado	MuseChem	M21X01265
Colesterol-PEG-Maleimida	Lípido Maleimida	Nanosoft polymers	30240206
DSPE-Maleimida	Lípido Maleimida	Nanosoft polymers	1079103
DSPE-mPEG2000-Maleimida	Lípido Maleimida	Nanosoft polymers	20490214
DSPE-PEG2000-Cy5	Lípido fluorescente	Nanosoft Polymers	135820215

Notas: 1- Nombre IUPAC de los excipientes disponible en el Anexo 1, Tabla A 2.

Tabla 3: Otros materiales utilizados durante la fabricación de las nanopartículas lipídicas.

Material	Función en la formulación	Proveedor	Números de Lote
Nile red	Fluoróforo	Sigma Aldrich	BCBV2046
Tampón citrato 5 mM	Tampón fabricación / purificación	Fischer scientific	Y20G505
Tampón PBS 10X	Tampón purificación	Fischer scientific	2572125 2522683
Etanol 96% v/v	Solvente fase lipídica	Panreac	0002319471
Agua millipore	Solvente	Interno	No aplica

Tabla 4: Secuencias de RNA utilizadas para su encapsulación y pruebas de silenciamiento

Nombre del RNA	Secuencia	Peso Molecular	Proveedor	Lote
siTCERG1	GGAGUUGCACAAGAUAGUU [dT] [dT]	13288	<u>Sigma Aldrich</u>	HA15456069
siGFP	CUACAACAGCCACAACGUC [dT] [dT]	13317	<u>Sigma Aldrich</u>	HA14456071
Ribonucleic acid from torula yeast ¹			<u>Sigma Aldrich</u>	WXBFI071V

Notas: 1- RNA de transferencia, genérico. Secuencia y peso molecular no especificados.

Tabla 5: Péptidos utilizados para la funcionalización de las nanopartículas lipídicas.

Péptido	Fórmula Química	Secuencia	Masa molecular
RVG (péptido C2)	C ₅₀ H ₈₃ N ₁₉ O ₁₆ S	ARGRSNTFIDC	1237,599
Cys-THRre	C ₇₄ H ₁₀₅ N ₂₁ O ₁₂ S ₂	CPWVPSWMPPRHT	1591,754
Angiopep2	C ₁₀₇ H ₁₅₄ N ₃₀ O ₃₂ S	CTFFYGGSRGKRNNFKKEY	2403,107
MiniAp-4	C ₄₂ H ₇₁ N ₁₃ O ₁₄ S	CDap(&)KAPETALD(&)	1013,496

Todos los péptidos utilizados en esta investigación fueron sintetizados y provistos por el grupo de investigación de la Dra. Macarena Sánchez (IPBLN-CSIC).

Adicionalmente para la preparación de soluciones de péptido y la reacción de funcionalización se utilizó agua Millipore®, tampón PBS (ver Tabla 2), ácido fórmico y EDTA.

Tabla 6: Materiales utilizados para la caracterización de las nanopartículas lipídicas.

Material	Proveedor	Referencia
Cubetas para espectrofotometría	Kartell®	0196100
Celda capilar plegada desechable	Malvern®	DTS1070
2-Propanol	VWR Chemicals	1.07022.4000
Acetato de amonio	Sigma Aldrich	23874
Kit de ensayo RNA Quan-it® y reactivo Ribogreen®	Fischer scientific	R11490
Tritón 100-X	Fischer scientific	HFH10
Reactivo de Ellman	Fischer scientific	22582
L-Cisteína	Fischer scientific	A10435.18
Kit de ensayo fluorimétrico para maleimida	Sigma Aldrich	MAK167
AccQ-Fluor Reagent Kit	Waters®	WAT0052881
Ácido clorhídrico	Fischer scientific	2378653
Agua Millipore®	Interno	No aplica
Acid α -aminobutyric (AABA)	Fischer scientific	11478843
Patrón H para aminoácidos	Fischer scientific	20088
Metanol	Fischer scientific	2496156

Tabla 7: Líneas celulares utilizadas para la evaluación biológica de las nanopartículas lipídicas.

Material	Proveedor	Referencia
Células epiteliales humanas embrionarias de riñón, HEK 293T	ATCC	CRL-3216
Célula inmortalizada de neuroblastoma humano, SH-SY5Y	ATCC	CRL-2266
Células endoteliales derivada de microvasos del lóbulo temporal humano, hCMEC/D3	Sigma Aldrich	SCC066
Células endoteliales ¹	Células obtenidas a partir de una colaboración con el <i>Blood Brain Barrier Laboratory</i> , Universidad de Artois, Francia. Modelo descrito en (535).	
Pericitos de origen bovino		

Notas: 1- Células endoteliales derivadas de células progenitoras de sangre de cordón umbilical CD34⁺.

Tabla 8: Anticuerpos empleados en el análisis de *Western blot*

Anticuerpo	Especie	Origen	Referencia
α TCERG1	Cobaya	IgG purificadas obtenidas en el laboratorio	No aplica
α GAPDH	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	SC-32313
α IgG GuineaPig-HRP	Cabra	Jackson ImmunoResearch	106-035-003
α IgG Mouse-HRP	Cabra	Perkin Elmer Life Science	NEF822001EA

Tabla 9: Oligonucleótidos empleados en el análisis de qPCR

Oligonucleótido	Secuencia	Proveedor
GAPDH Fw	GATGGGGAAGGTGAAGGTCG	Metabion
GAPDH Rv	GGGTCATTGATGGCAACAATATC	Metabion
TCERG1 Fw	GATCCACGTTACAAAGCAGTAG	Metabion
TCERG1 Rv	CCCTTTCTCGTTCTCGAAGG	Metabion

Tabla 10: Medios de cultivo y otros reactivos utilizados para la evaluación biológica de las nanopartículas lipídicas (continúa)

Material	Proveedor	Referencia
Medio de cultivo: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Bajo en glucosa	Gibco® (Life technologies)	11885084
Medio de cultivo: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Alto en glucosa	Gibco® (Life technologies)	11965092
DMEM bajo en glucosa sólido	Sigma-Aldrich	D5523
Suero bovino fetal (FBS)	Gibco® (Life technologies)	16000044
Tripsina-EDTA 0,25%	Gibco® (Life technologies)	25200072
Medio de cultivo para células endoteliales	Innoprot	P60104
Suplemento de crecimiento para células endoteliales	Sigma Aldrich	02-102
L-Glutamina	Gibco® (Life technologies)	25030081
Gentamicina	Sigma Aldrich	G12272
Penicilina/Estreptomina	Thermo Fisher Scientific (Gibco) -	15140122
Gelatina	Sigma Aldrich	G2500

Tabla 10 (continuación): Medios de cultivo y otros reactivos utilizados para la evaluación biológica de las nanopartículas lipídicas

Material	Proveedor	Referencia
Matrigel	Corning	CLS354234
Ringer HEPES	Preparación interna	No Aplica
Lipofectamina 2000	Invitrogen®	11668030
Paraformaldehído	Sigma Aldrich	8.18715.1000
Prolong Gold Antifade DAPI	Fischer scientific	62248
SDS 2X	Preparación interna	NA
Gel de acrilamida/bisacrilamida	Biorad	1610156
Membrana de nitrocelulosa	Amersham Biosciences	15269794
<i>SYBR™ iTaq Universal SYBR® Green Supermix</i>	Biorad	1725124
EndoGRO-Kit® + suplementos (Factor de crecimiento epidérmico, rh EGF; Hidrocortisona hemisuccinato, heparina sultafo y ácido ascórbico)	Sigma Aldrich	SCME004
Colágeno de cola de rata	Fischer scientific	A1048301
Solución amortiguadora de extracción RIPA	Fischer scientific	89900
Solución amortiguadora Laemmli	Preparación interna	No Aplica
Tris	VWR	0497-1KG
Glicina	ITW Reagents	A1067,1000
Leche desnatada en polvo	Comercial	No Aplica
Tween 20	PanReac AppliChem	A4974
Solución de revelado Western Lightning® Plus ECL Oxidizing Reagent	Fisher Scientific	50-904-9326
TRIzol	Fisher Scientific	15596026
Cloroformo	Merck	1.02445.1000
Agua Libre de RNAasa	Qiagen	1017979
5X PrimerScript RT Master Mix	Takara Bio Europe	XU0002
Reactivo A para método de Lowry	Biorad	5000113
Reactivo B para método de Lowry	Biorad	5000114
Reactivo S para método de Lowry	Biorad	5000115
Lucifer yellow	Sigma Aldrich	L0259

3.1.2 Equipos

Esta sección detalla el equipamiento empleado a lo largo de las distintas fases de la investigación. Se presentan los equipos empleados en la fabricación de nanopartículas (3.1.2.1 y 3.1.2.2) así como los requeridos para distintas actividades relacionadas con su caracterización físico-química (3.1.2.3 y 3.1.2.4) y biológica (3.1.2.5): además la subsección 3.1.2.6 incluye equipo general de laboratorio empleado en cualquiera de las fases mencionadas.

3.1.2.1 Equipos empleados en la fabricación de las nanopartículas lipídicas

- Controlador de flujo microfluídico por presión. Marca Elvsys (Francia), modelo OB1 MK3⁺. Rango de presiones entre 0 y 8000 mbar
- Sensor de flujo másico térmico. Marca Elvsys (Francia), modelo MFS-D-5. Rango de flujo entre 0 y 5000 µl/min (para agua)
- Sensor de flujo másico térmico. Marca Elvsys (Francia), modelo MFS-D-4. Rango de flujo entre 0 y 10000 µl/min (para etanol, o entre 0 y 1000 µl/min para agua)
- Chip microfluídico:
 - Chip de vidrio, diseño de mezcla por difusión, proveedor Elvsys (Francia, sin referencia disponible)
 - Chip de policarbonato, diseño de mezcla por difusión, proveedor ChipShop (Alemania), código de producto 10000018
 - Chip de policarbonato, diseño *Herringbone*, proveedor ChipShop (Alemania), código de producto 10000019
 - Chips de zeonor y policarbonato, diseño *Herringbone*, proveedor ChipShop (Alemania), códigos de producto 10001930 y 10001931

3.1.2.2 Equipos empleados en la purificación de las nanopartículas lipídicas

- Kit de *cassettes* de diálisis Slide-A-Lyzer®. Marca Thermo Fisher Scientific, código 66382. Límite de exclusión molecular de 10 K de capacidades de 3 mL, 12 mL y 30 mL
- Kit de tapones de diálisis Slide-A-Lyzer® MINI. Marca Thermo Fisher Scientific, código 69572. Límite de exclusión molecular de 10 K de capacidades de 0,5 y 2 mL
- Agitador magnético RT10 (0003691100), Marca IKA (Alemania)
- Agitador magnético MR Hei -Tec. Marca Heidolph (Alemania)

3.1.2.3 Equipo empleado en la liofilización de las nanopartículas

- Liofilizador LyoLab C85 20. Marca Coolvacuum (Barcelona)

3.1.2.4 Equipo empleado para la caracterización de las nanopartículas lipídicas

- Zetasizer Nano ZS90. Marca Malvern (Reino Unido)
- Zetasizer Nano -Z. Marca Malvern (Reino Unido)
- Microscopio electrónico de transmisión (TEM) Tecnai Spirit Spirit 120 kV. Marca FEI Company (Estados Unidos)
- Microscopio de fuerza atómica Multimode 8 con electrónica de control Nanoscope V
- Marca Bruker (Alemania).
- Espectrofotómetro Varioskan LUX 3020-80300. ThermoScientific (Estados Unidos)
- Espectrofotómetro Agilent Cary 3500 UV-VIS Multicell. Marca Agilent (Australia)
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia 1100 Series. Marca Agilent (Australia) con la siguiente configuración:
 - Detector de absorbancia DAD G1315 A
 - Automuestreador G1313A
 - Controlador de temperatura de columna G1316A
 - Columna: Symmetry C18 3µm, 4,6mm x 100mm
 - Columna: Zorbax Silica 5 µm, 4,6 x 150mm
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia Delta 600. Marca Waters (Estados Unidos) con la siguiente configuración:
 - Detector de absorbancia 2487 Dual λ
 - Automuestreador 717 plus
 - Controlador de temperatura de columna Waters TCM II
 - Columna: Nova-pack C18 4 µm, 3.9x150mm

3.1.2.5 Equipo utilizado en la evaluación del desempeño biológico de las LNPs

- Cabina de flujo laminar EuroAire, Modelo CSB120. Marca TDi (España)
- Centrífuga 5810R. Marca Eppendorf (Alemania)
- Centrífuga 5415R. Marca Eppendorf (Alemania)
- Incubador ThermoForma, Modelo 311. Marca ThermoScientific (Estados Unidos)
- Ultracongelador Forma-86C ULT Freezer. Marca ThermoScientific (Estados Unidos)
- Lector de microplacas VersaMax™. BioNova científica S.L. (España)
- Microscopio óptico con cámara acoplada, modelo CKX53, Marca Olympus
- Citómetro FACSymphony. Marca BD Biosciences (Estados Unidos)
- Celda Mini trans-Blot®. Marca BioRad (Estados Unidos)

- Transiluminador UV Gel DocTM EZ Imager. Marca BioRad (Estados Unidos)
- Luminómetro FB12. Marca Berthold Detection Systems (Alemania)
- IVIS Spectrum In Vivo Imaging System. Marca Revvity (Estados Unidos)
- Espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop®. ProdigyScientific (Estados Unidos)
- Equipo de revelado CURIX 60. Marca Agfa (Bélgica)
- Microscopio confocal SP8. Marca Leica (Alemania)
- Lector de placas Infinite F200. Marca Tecan (Suiza)
- Termociclador CFX96 Real-Time PCR. Detection Systems (Estados Unidos)
- Placas de cultivo P100. Placas de poliestireno con tratamiento estándar para cultivo celular de 100 mm de diámetro (Ref 353003). Thermo Fisher (Estados Unidos)
- Placa de cultivo de 6 pocillos, Placas de poliestireno con tratamiento estándar para cultivo celular de 35 mm de diámetro (Ref 353046). Thermo Fisher (Estados Unidos)
- Placas de cultivo 12 pocillos. Placas de poliestireno con tratamiento estándar para cultivo celular de 12 mm de diámetro (Ref 150628). Thermo Fisher (Estados Unidos)
- Pack de pocillos e Insertos de transwell. Tamaño de poro de 0,4 μm de diámetro, área de cultivo de 1,12 cm^2 y un tratamiento estándar para el cultivo celular referencia CLS3401, Corning (Estados Unidos)
- Cámara de conteo de células de Neubauer
- *Cell scraper* (raspador de células)
- Lentillas circulares de vidrio borosilicato de 12 y 18 mm de diámetro para microscopía confocal

3.1.2.6 Equipo general de laboratorio utilizado a lo largo de las diferentes técnicas

- Balanza analítica Dual Range XS105. Marca Mettler Toledo (Suiza)
- Balanza de precisión PJ300. Marca Mettler Toledo (Suiza)
- Micropipetas de 1 μL , 20 μL , 200 μL y 1000 μL , y sus respectivas puntas.
- Pipetas de 5 mL, 10 mL y 30 mL.
- Pipetas pasteur.
- Probetas de 5 mL, 50 mL, 500 mL y 5000 mL.
- Vasos de precipitados de 5 mL, 25 mL, 250 mL y 1000 mL.
- Viales de vidrio (tipo II) de 5 mL, y tapones elastoméricos.
- Espátulas y microespátulas.
- Bandejas de pesaje.
- Soporte universal.
- Termómetros.

- Jeringa de 3 mL, 5 mL y 30 mL.
- Filtros para jeringa 0,45 μm , 0,22 μm y 0,2 μm .
- Placas de 96 pocillos.
- Ultracongelador ULF -86. Marca Infirico MedCare (España)

3.2 Metodología y técnicas analíticas

3.2.1 Desarrollo de nanopartículas lipídicas

3.2.1.1 Preformulación de las nanopartículas lipídicas

Antes de la formulación de las nanopartículas lipídicas se implementó una estrategia de desarrollo basada en los principios de Calidad por Diseño (QbD) (390,536). Específicamente, este desarrollo inició con la definición de un perfil de calidad objetivo de producto (QTPP) para preestablecer los requisitos y objetivos principales antes de la formulación. Basándose en este perfil se identificaron los atributos de calidad que impactan en ese perfil de calidad y se determinó la criticidad de esos atributos. Posteriormente, se identificaron los parámetros críticos del proceso (CPP) que impactan esos atributos críticos de calidad (381).

La definición de los CQA y CPP se realizó apoyada en referencias bibliográficas (384,402) y la experiencia acumulada por el grupo investigador. Seguidamente se realizó un análisis de riesgo de los CPP para priorizar su estudio dentro del espacio del diseño (381). Este análisis guio la selección de variables experimentales para la fase de formulación, aplicables a los procedimientos de fabricación y funcionalización descritos en apartados posteriores. Entre las estrategias de evaluación de variables, se destacó el uso del Diseño de Experimentos (DoE) por su eficacia en la adquisición de conocimiento acerca de la interrelación de las variables (381). En la sección 3.3.1.1 se presentan los detalles de los DoE aplicados durante la optimización de la fórmula de nanopartículas lipídicas.

El establecimiento del tipo de nanopartícula lipídica y el método de fabricación se basó en una exhaustiva revisión bibliográfica del estado del arte, enfocada en las características definidas en el QTPP. Esta revisión consideró no solo los atributos deseables para la eficacia terapéutica sino también la factibilidad de escalabilidad industrial (339,340,355,537).

3.2.1.2 Fabricación de nanopartículas

Para la fabricación de las LNPs se aplicó el método de inyección de etanol, realizada a través de mezcla microfluídica (128,339,359,365,366,368,538). Brevemente, este método consiste en la mezcla de rápida de soluciones acuosas y orgánicas en condiciones controladas, que conduce a la súper saturación de los lípidos disueltos en la fase orgánica, lo que conlleva una nucleación y formación homogénea de las LNPs (339).

La fase acuosa consistió en una solución amortiguadora que contiene disuelto el RNA a encapsular. Dicha solución amortiguadora debe tener un pH inferior al pKa del lípido ionizable para asegurar su protonación y que así pueda interactuar electrostáticamente con el RNA. Durante esta investigación se probó el uso de agua y de solución amortiguadora de citrato (pH = 5,5) a concentración total de 0,0115 y 5 mM. En las muestras preparadas para los experimentos de silenciamiento, se encapsuló siRNA específico (ver Tabla 4 y sección 3.2.4.5).

En los estudios de la influencia de los parámetros de formulación y proceso en los CQA, se utilizó tRNA genérico (Tabla 4) como oligonucleótido modelo por razones de costo.

La fase orgánica correspondió a una solución etanólica de los constituyentes lipídicos, que se probó en concentraciones totales de 2,5; 20 y 25 mM. A excepción del DoE donde se varió la proporción de los constituyentes, que se detalla en la sección 3.3.1.1.1, el resto de las fabricaciones emplearon como base la composición lipídica descrita en la Tabla 11.

Tabla 11: Composición del vehículo lipídico preseleccionado para la fabricación de nanopartículas lipídicas.

Material	Porcentaje%
Lípido ionizable/catiónico (DLin-MC3-DMA/DOTAP)	40
Colesterol*	48,5
Fosfolípido (DSPC)	10
Lípido pegilado (DSPE-mPEG-2000)	1,5

Nota: *El colesterol corresponde al excipiente “cantidad suficiente para”.

Dependiendo del objetivo específico de cada experimento, la composición de las nanopartículas basada en la tabla 9 puede someterse a algunas modificaciones. Por ejemplo, puede incluir entre un 2% y un 10% de distintos tipos de lípido maleimida, utilizados para la funcionalización superficial. Además, para facilitar la visualización mediante técnicas de fluorescencia, se puede incorporar un 1,5% de DSPE-mPEG-Cy5 o Nile Red. En estos casos se ajustó el porcentaje de colesterol consecuentemente.

Antes de la mezcla microfluídica, las soluciones lipídicas se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,45 μm para asegurar la ausencia de partículas. La fabricación se realizó a temperatura ambiente, empleando flujos totales de entre 300 y 6000 mL/min y proporciones de flujo (FRR) acuoso y etanólico entre 3 y 9. Las condiciones específicas aplicadas en el DoE para optimizar las condiciones de fabricación se detallan en la sección 3.3.1.1.1. La configuración del equipo de fabricación, incluyendo la diagramación del proceso de purificación (que será descrito en la siguiente subsección), se ilustra en la Figura 24.

3.2.1.3 Purificación de nanopartículas

Cuando fue necesario, la eliminación de etanol o cualquier otro residuo de la dispersión de LNPs se realizó por sustitución de medio a través de la diálisis (128), seleccionando el equipo y volumen de solución amortiguadora de intercambio según el volumen de dispersión a dializar. Si el volumen de suspensión a dializar fue de 0,1 mL o 0,5 mL, se utilizaron los tapones de diálisis dentro de tubos Falcon®, y se realizó la diálisis con 15 mL y 45 mL de tampón de intercambio en cada repetición, respectivamente. Para los volúmenes de suspensión de 3 mL o 9 mL, se utilizaron los *cassettes* de diálisis con flotador, y se introdujeron en vasos de precipitados con 400 mL y 600 mL de tampón de intercambio en cada repetición, respectivamente.

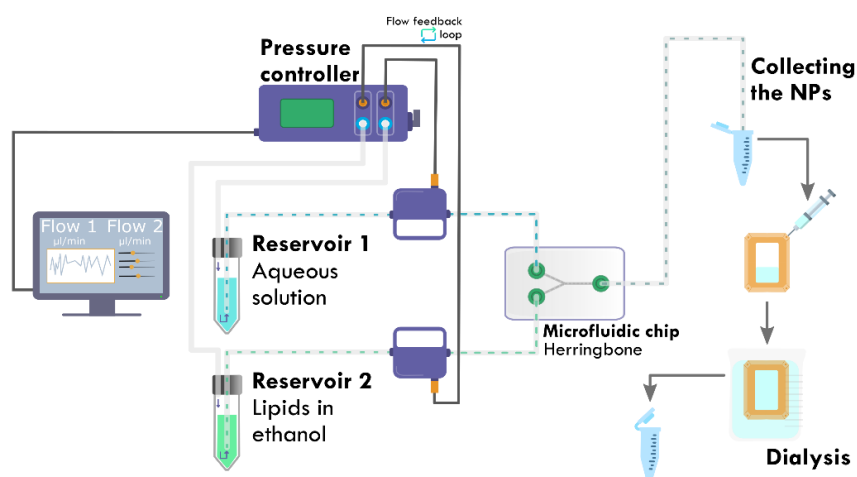


Figura 24: Diagrama de la fabricación y purificación de nanopartículas lipídicas

El equipo de mezcla microfluídica cuenta con dos reservorios, uno para la solución acuosa (reservorio 1) y otro para la solución etanólica (reservorio 2). Ambas soluciones confluyen en un chip microfluídico, con un flujo controlado precisamente a través de un regulador de presión. Las nanopartículas formadas se recogen y se someten a purificación por diálisis. Imagen de elaboración propia.

La diálisis se realizó mediante agitación continua a temperatura ambiente por al menos 18 horas. El proceso se dividió en tres pasos consecutivos: dos ciclos iniciales de dos horas cada uno, seguidos de un tercer ciclo hasta la mañana siguiente del día de ejecución del procedimiento. En cada etapa se renovó la solución amortiguadora de intercambio. Los volúmenes antes y después de la diálisis se registraron para evaluar si en el proceso ocurrió dilución de la muestra. En caso de confirmarse una dilución, se calculó el factor de dilución correspondiente y ese dato se empleó para ajustar los cálculos de concentración teórica de componentes agregados.

3.2.1.4 Liofilización de las nanopartículas lipídicas

La liofilización es un método en el que se elimina el solvente de una solución o suspensión mediante congelación, y secado por sublimación a presión reducida. Se emplea habitualmente para ampliar la vida útil de las preparaciones farmacéuticas (539,540). En el caso de esta investigación se empleó con fines de preparación de la muestra para fines analíticos. Particularmente, para eliminar todo el solvente, y proceder a resuspender con etanol, para disolver así los componentes y poder emplear dicha muestra en análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (sección 3.2.3.7). La liofilización de las muestras de nanopartículas se llevó a cabo en el equipo LyoLab C85 20 (Coolvacuum) empleando el protocolo señalado en la Tabla 12.

Tabla 12: Fases de la liofilización de las suspensiones de nanopartículas lipídicas para su deshidratación con fines analíticos.

Fase del proceso	Temperatura	Tiempo	Presión (bar)
Congelación	- 60,0 °C	8 horas	Atmosférica
	- 50,0 °C	30 minutos	0,300
Secado primario	0,0 °C	10 horas	0,150
	25,0 °C	6 horas	entre 0,002-0,008

3.2.2 Funcionalización de nanopartículas lipídicas

3.2.2.1 Preparación de muestra de nanopartículas

Para realizar la funcionalización con péptidos de las nanopartículas desarrolladas se parte únicamente de formulaciones que posean algún porcentaje de lípido maleimida en su composición. Antes de proceder con la funcionalización, las nanopartículas fueron purificadas con PBS 1X. Alternativamente algunas muestras de nanopartículas fueron funcionalizadas sin realizar la diálisis previa. Independientemente de la realización de la diálisis o no, la cantidad de maleimida disponible se determinó a partir de la ejecución del procedimiento indicado en la sección 3.2.3.8.

3.2.2.2 Preparación de la solución de péptidos

Las soluciones de péptidos para funcionalización se prepararon inmediatamente antes de su utilización empleando PBS 1X (o PBS 2X si las muestras de nanopartículas a funcionalizar no fueron previamente dializadas) con pH de 7,4. Adicionalmente se agregó EDTA para obtener una concentración de 3 mM.

La concentración a la que se prepara el péptido se estableció a partir de la cuantificación maleimida disponible. Esta solución debía tener una concentración 1,25 veces superior a la concentración de maleimida disponible, para mantener una proporción maleimida:péptido de 1:1,25. En algunos experimentos también se probaron otras proporciones maleimida:péptido tales como 1:0,5; 1:1; o 1:1,5; realizando los ajustes correspondientes en la concentración de péptido.

3.2.2.3 Incubación y purificación final

Volúmenes iguales de muestras preparadas según lo indicado en 3.2.2.1 y 3.2.2.2 se agregaron en un tubo de capacidad apropiada y se agitaron, protegidos de la luz, durante 20 minutos, 40 minutos, 1 hora o 2 horas, según el procedimiento experimental. En algunos experimentos se probó el efecto del pH de funcionalización empleando solución amortiguadora de fosfatos con un pH ligeramente ácido, y ligeramente básico, en comparación con el uso del pH de 7,4. Una vez realizada la incubación, las muestras fueron dializadas con PBS 1X siguiendo el procedimiento indicado en 3.2.1.3.

3.2.3 Caracterización de las nanopartículas lipídicas

3.2.3.1 Determinación del tamaño de partícula y PDI

El tamaño promedio y el índice de polidispersidad (PDI) de las nanopartículas lipídicas se determinaron midiendo la distribución del tamaño de partícula (PSD), que se realizó empleando la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) con un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern instruments). Este equipo calcula el diámetro hidrodinámico de las partículas a partir de los valores de dispersión de la luz, la cual refleja la velocidad de movimiento de las partículas en suspensión. Dicha velocidad de difusión, dentro del movimiento browniano de las partículas, resulta mayor en partículas de menor tamaño (541–543).

Cada evaluación se realizó por triplicado, donde cada repetición corresponde al promedio de 10 mediciones. Empleando el software Zetasizer 7.13 se obtuvo un valor promedio de tamaño en nanómetros, una medición del PDI (calculado como la desviación estándar de las 10 mediciones

dividida por el promedio) y los valores promedio y proporción de los tres picos principales, si existiesen múltiples picos.

Para las mediciones, se ajustaron los parámetros del equipo estableciendo los índices de refracción según los materiales empleados: de 1,33 para el dispersante y de 1,45 para el material lipídico. Además, se ajustó la cantidad de nanopartículas para mantener una tasa de conteo de partículas (*count rate*) entre 100.000 y 500.000 conteos por segundo (100-500 kcps).

3.2.3.2 Determinación del potencial zeta

La carga superficial de las formulaciones se midió usando un Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments), que calcula el potencial zeta a través de la movilidad electroforética de las partículas bajo un campo eléctrico. Dentro de este campo eléctrico, las partículas se mueven hacia el electrodo que posee carga opuesta a la de las mismas partículas. Específicamente el equipo mide la velocidad de desplazamiento, empleando velocimetría por láser Doppler (543–545).

El potencial zeta refleja al potencial cinético que existe entre la primera capa de iones que rodean a la nanopartícula (capa de Stern) y segunda capa difusa de iones que se encuentran en suspensión y que rodean a esta primera capa (545,546). Así, es un indicador de la carga superficial de la nanopartículas y corresponde a una medida de la estabilidad física de las nanoformulaciones. Partículas con valores de potencial zeta cercanos a la neutralidad tienen a aglomerarse o flocular, mientras que valores absolutos más altos (convencionalmente en valores por sobre + 30 mV o bajo -30 mV) tienen a repelerse y mantenerse en suspensión (364,368). La representación del modelo de doble capa iónica y el principio de la evaluación del potencial zeta a través de la velocimetría por láser Doppler se ilustra en la Figura 25.

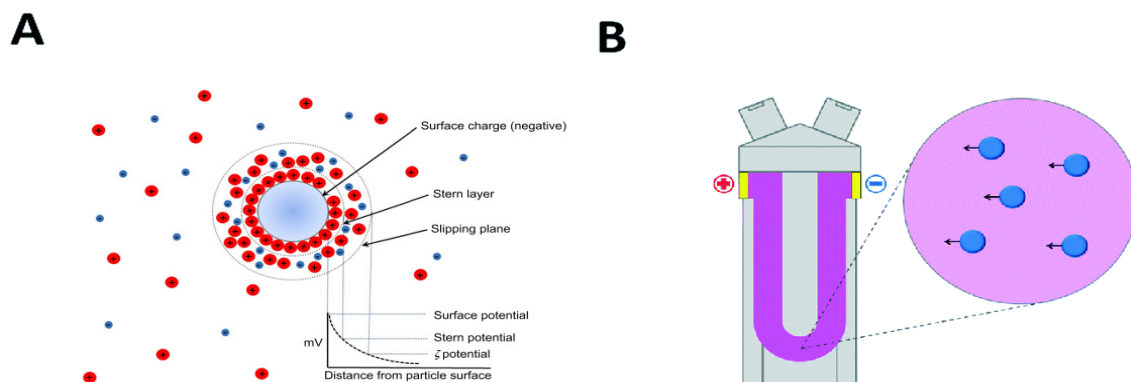


Figura 25: Principio fundamental y evaluación del potencial zeta

La figura ilustra el modelo de la doble capa iónica y la evaluación del potencial zeta mediante velocimetría por láser Doppler. En el panel A se representa la distribución de iones alrededor de una partícula cargada, destacando la capa de Stern (inmediata a la superficie de la partícula, y compuesta por iones con carga opuesta) seguida de la capa difusa (compuesta por iones de ambos tipos de carga). También muestra la relación entre el potencial zeta y los potenciales de las zonas de corte de cada capa. El panel B ilustra la migración de partículas cargadas dentro del campo eléctrico de una celda de electroforesis. Estas partículas migran hacia el electrodo de carga opuesta a una velocidad que refleja su potencial zeta, y que es medida a través de la dispersión de láser por las partículas en movimiento. Imágenes modificadas de (544,545).

Las muestras para potencial zeta se midieron con la misma dilución de concentración ajustada para el *count rate* de la prueba de determinación de tamaño de partícula. Cada evaluación se realizó por triplicado, donde cada repetición corresponde al promedio de 100 mediciones empleando el nano software 7.13. Las condiciones de medición fueron a temperatura ambiente

(25 °C), y se obtuvieron valores de potencial zeta promedio expresados en milivoltios (mV), además de datos de movilidad electroforética ($\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{Vs}$) y conductividad (mS/cm).

3.2.3.3 Obtención de imágenes por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía TEM permite ampliar imágenes hasta un millón de veces utilizando un haz de electrones de alta velocidad que atraviesa muestras ultrafinas, típicamente colocadas en rejillas de carbono y tratadas con solución de tinción para mejorar el contraste. Las lentes del microscopio dirigen y enfocan los electrones hacia una pantalla fluorescente o placa fotográfica, capturando imágenes bidimensionales que detallan la superficie y estructura de la muestra. Este proceso facilita el estudio morfológico y dimensional de los materiales a nanoescala (318,379,548).

Para evaluar la conformación y uniformidad de las nanopartículas, y realizar una comprobación cualitativa de su tamaño medido por DLS, se prepararon muestras con distintas diluciones sobre rejillas de cobre recubiertas de carbón. Antes de colocar la muestra, estas rejillas se irradiaron con luz ultravioleta para cargarlas, facilitando la adhesión de las nanopartículas. La suspensión se mantuvo en contacto con la placa durante 10 o 30 segundos. Posteriormente se eliminó el exceso de suspensión de nanopartículas y se tiñeron con una solución de metilcelulosa al 4% o uranil acetato. Las observaciones se realizaron empleando un microscopio electrónico TEM Tecnai Spirit con un cátodo LaB6, captando las imágenes a 120 kV con una cámara CCD Megaview de 1376 x 1024 píxeles.

3.2.3.4 Obtención de imágenes por microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía AFM permite analizar la topografía de superficies con una resolución que puede llegar al nivel atómico. La medición se realiza mediante la detección de fuerzas entre una punta muy pequeña y la superficie de la muestra. Estas fuerzas son detectadas durante el desplazamiento de la punta y traducidas a una descripción topográfica de la muestra analizada con un tratamiento de la muestra relativamente sencillo (549,550).

Las imágenes se obtuvieron empleando un microscopio de fuerza atómica Multimode 8 con electrónica de control Nanoscope V (Bruker) en modo “no contacto”. Las muestras se depositaron sobre una mica grafito pirolítico altamente orientado, y se analizaron utilizando una punta de silicio. Se realizaron escaneos a una velocidad de 1 Hz sobre un área de 5 x 5 μm . Posteriormente, las imágenes se procesaron empleando el software Nanoscope Analysis.

3.2.3.5 Análisis mediante microscopía de luz interferométrica

La microscopía de luz interferométrica emplea la interferencia de ondas de luz para detectar, contar y rastrear partículas en suspensión. Es un método de aplicación sencilla y rápida, cuya configuración se muestra en la Figura 26 (551–553). Esta técnica se empleó para determinar la cantidad de nanopartículas en la suspensión prototipo obtenida durante esta investigación. Para ello se enviaron muestras de 6 diferentes lotes al laboratorio de la compañía Myriade (Francia), para evaluación con su equipo VideoDrop®. Se prepararon 3 diluciones de cada muestra (1 en 100, 1 en 200 y 1 en 300) y se midió el tamaño y la concentración de las nanopartículas por mililitro, para posteriormente calcular el promedio y la desviación estándar de los datos.

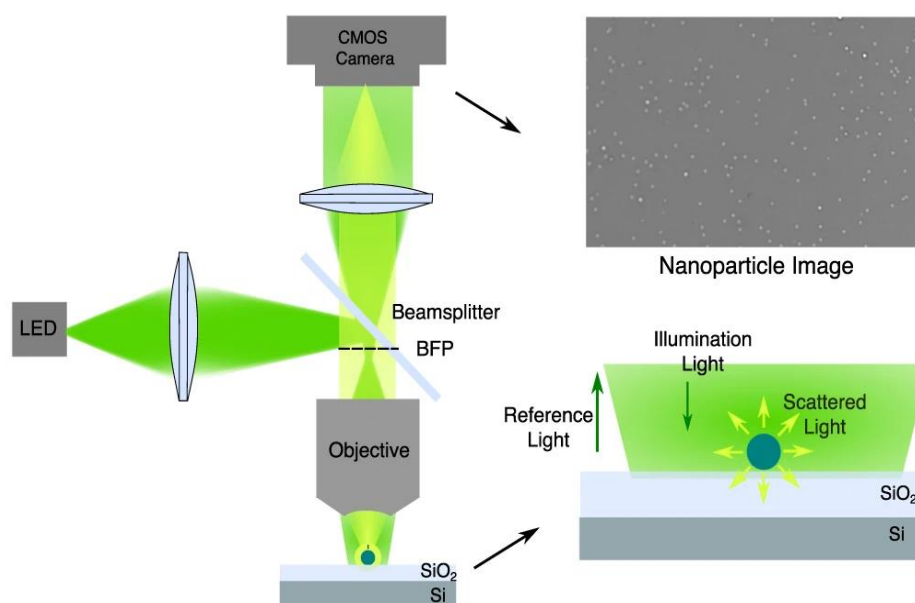


Figura 26: Diagrama de un equipo de microscopía de luz interferométrica

Una fuente de luz ilumina la muestra colocada sobre un sustrato de silicio y óxido de silicio. La luz dispersada por las nanopartículas y la luz reflejada por el sustrato interfieren, y esa interferencia es captada por la cámara del equipo. Cada punto de interferencia corresponde a una partícula. El software del equipo analiza estas interferencias para contar las partículas y correlacionarlas con el volumen de la muestra, proporcionando el valor de concentración. El tamaño se determina mediante análisis del patrón de interferencia para determinar la velocidad de difusión de las nanopartículas, bajo el mismo principio que aplica la técnica de DLS. Imagen reproducida de (553).

3.2.3.6 Evaluación de la eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación se determinó empleando el kit comercial Ribogreen® y su reactivo Quant-it® (554,555) adaptando su protocolo estandarizado. El fundamento de la técnica es la formación de un complejo que exhibe fluorescencia al reaccionar el reactivo Quant-it® con los ácidos nucleicos de cadena sencilla.

Brevemente, se prepararon cantidades suficientes de las soluciones requeridas para el ensayo a partir de los concentrados que forman parte del Kit: A) Solución amortiguadora del ensayo, B) solución amortiguadora de lisis (empleando A y tritón 100-X) y C) el reactivo Quant-it®. Adicionalmente se preparó una curva de calibración con estándar de RNA ribosomal a concentraciones de 0, 20, 100, 500 y 1000 nmol/mL.

Con la concentración teórica de RNA en los lotes a evaluar, se realizó una dilución de las nanopartículas empleando la solución “A” para ajustar su contenido dentro del rango de la curva de calibración. En una placa de 96 pocillos se prepararon las muestras para evaluar el RNA libre y el RNA total de cada muestra, empleando 3 pocillos para cada una. Para medir el RNA libre se combinaron 10 µL de muestra en el pocillo, 90 µL de A y 100 µL de C. Para el RNA total se combinan 10 µL de muestra en el pocillo con 100 µL de C y 90 µL de B. Al añadir el reactivo B, el tritón causa la lisis total de las nanopartículas y, por lo tanto, la liberación de RNA encapsulado.

La placa se incubó protegida de la luz y se leyó en el Espectrofotómetro Varioskan LUX 3020-80300 (ThermoScientific) a una longitud de onda de excitación de 480 nm y 520 nm de emisión. Tras ajustar los datos con la curva de calibración, la eficiencia de encapsulación se calculó empleando la ecuación 1.

Ecuación 1: Eficiencia de Encapsulación

$$EE = \frac{\text{Cantidad de RNA total} - \text{cantidad de RNA externo}}{\text{Cantidad de RNA Total}} \times 100$$

3.2.3.7 Identificación y cuantificación de materiales por HPLC-UV

Las técnicas de cromatografía líquida se emplean para separar moléculas según sus propiedades químicas (268) y se han aplicado en el análisis de nanopartículas acopladas a distintos detectores, como el detector de dispersión de luz evaporativa o la espectrofotometría de masas (442,557,558). Durante la presente tesis, esta técnica se investigó para el análisis de la composición lipídica de las nanopartículas.

Antes de su evaluación, las nanopartículas fueron sometidas a liofilización para eliminar el agua (sección 3.2.1.4), y luego se resuspendieron en etanol, disolviendo todos los componentes lipídicos. Para su análisis se empleó un cromatógrafo Agilent 1100 Series, detector DAD G1315A, automuestreador G1313A y controlador de temperatura de columna G1316A.

La definición de las condiciones cromatográficas, así como la composición de la fase móvil y el tipo de fase estacionaria, fue un aspecto que formó parte de esta investigación. Por lo tanto, el método obtenido es uno de los resultados destacados. Este desarrollo analítico tenía como objetivo poder identificar y diferenciar todos los componentes lipídicos, empleando soluciones lipídicas de cada componente por separado como patrón estándar a una concentración de 1 mM. Las condiciones analíticas empleadas y las observaciones obtenidas se presentan en la sección de resultados (sección 4.2.1.2).

Posteriormente a este desarrollo, la técnica se aplicó particularmente para evaluar la distribución relativa de los lípidos maleimida, comparando las señales de muestras sin purificar y purificadas. Esto se realizó con el fin de detectar la eliminación de la maleimida sobrenadante y entender cómo la composición de la solución amortiguadora empleada en la diálisis afecta la disponibilidad de maleimida, empleando la Ecuación 2.

Ecuación 2: Cálculo de la maleimida sobrenadante

$$\text{Maleimida sobrenadante} = MT - Mpd$$

Donde MT, es la maleimida total obtenida por el método HPLC sin aplicar ninguna diálisis, y Mpd es la maleimida obtenida por el mismo método HPLC, pero posterior a realizar la diálisis.

EL método HPLC-UV también se aplicó para dar seguimiento a la reacción de funcionalización, observando la desaparición del pico correspondiente al excipiente funcional, y la aparición de picos secundarios correspondientes al complejo maleimida/péptido.

3.2.3.8 Cuantificación de la maleimida disponible para la funcionalización

Se emplearon dos métodos para cuantificar exclusivamente la maleimida disponible, excluyendo la que podría estar encapsulada dentro de las nanopartículas. La primera corresponde a una técnica colorimétrica que usa el reactivo de Ellman; mientras que la otra consistió en una técnica fluorimétrica que emplea un kit comercial de la casa Sigma Aldrich (MAK 167).

El método de Ellman se basa en la reacción entre el 5,5'-dithio-bis-(2-ácido nitrobenzoico), con grupos sulfhidrilos libres, formando un compuesto disulfuro y liberando una molécula de 5-

nitro-2(ácido tiobenzoico) que posee un fuerte color amarillo con un pico de absorción que se cuantifica a 412 nm (559).

En este estudio, se añadió un exceso exactamente medido de L-cisteína (posee un sulfhidrilo libre) a una solución de maleimida y se incubó a pH 8 durante 20 minutos. Posteriormente, se cuantificó la cisteína residual empleando espectrofotometría visible mediante una curva estándar, preparada a concentraciones entre 0 y 1,5 mM, permitiendo calcular por diferencia la cisteína que reaccionó con la maleimida. Las cantidades de muestra y de cisteína en exceso se ajustaron de forma teórica para asegurar que el exceso de cisteína estuviera dentro del rango de la curva estándar.

A diferencia del ensayo de Ellman, y otros ensayos colorimétricos que corresponden a determinaciones indirectas de la cantidad de maleimida (560), el principio del kit fluorimétrico empleado es la reacción directa y específica de la molécula de maleimida con un reactivo exclusivo que resulta en un complejo que exhibe fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 490 nm, y una de emisión de 525 nm (561)

El análisis se llevó a cabo con nanopartículas conteniendo diferentes tipos y cantidades de lípidos maleimida con y sin diálisis. De acuerdo con las instrucciones del fabricante se preparó la solución amortiguadora con el reactivo para formar el complejo fluorescente, además de una curva estándar de maleimida en concentraciones de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156 y 0 mM. También se preparó una curva de calibración control incluyendo además un volumen de nanopartículas sin maleimida.

Las muestras para cuantificar se diluyeron adecuadamente para que su concentración teórica se ajustara a los límites de la curva estándar. Cada muestra se preparó por triplicado, y tras 25 minutos de incubación con el reactivo para formar el complejo, se leyó en el espectrofotómetro Varioskan LUX 3020-80300 (ThermoScientific) a 490 nm de excitación y 525 nm de emisión y se realizaron los cálculos correspondientes para obtener la concentración de maleimida disponible.

La combinación de los datos obtenidos en esta cuantificación con los datos provenientes del análisis HPLC-UV (sección 3.2.3.7) permiten trazar la distribución de la maleimida durante las fases de la formulación empleando las ecuaciones 2 y 3.

Ecuación 3: Cálculo de la maleimida encapsulada

$$\text{Maleimida encapsulada} = M_{pd} - M_{sup}$$

Donde M_{pd} es la maleimida obtenida por el mismo método HPLC, y M_{sup} es la maleimida superficial obtenida por el método fluorimétrico, aplicado a muestras previamente dializadas.

3.2.3.9 Cuantificación de péptidos mediante HPLC-UV por hidrólisis y derivatización de aminoácidos

El análisis de aminoácidos se puede llevar a cabo realizando la derivatización con el agente 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato, el cuál reacciona con las aminas primarias y secundarias presentes en los aminoácidos formando un complejo altamente estable que puede ser detectado a 254 nm con técnicas habituales de HPLC-UV (562). Para su análisis se empleó un cromatógrafo Waters Delta 600, detector de absorbancia 2487 Dual λ , automuestreador 717 plus y, controlador de temperatura de columna Waters TCM II.

Para esta evaluación se tomaron alícuotas de nanopartículas funcionalizadas que tuviesen un contenido teórico de péptido de al menos 0,300 mM. Estas alícuotas se enviaron para su

evaluación a la Unidad de Técnicas Separativas de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB). Las muestras se hidrolizan en tubos de vidrio con HCl 6 M (0,1-1% fenol) durante 24 horas a 110 °C. Posteriormente se evaporan a sequedad, se redisuelven en H₂O (calidad HPLC) y se filtran. La muestra del filtrado se derivatiza con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato según el método AccQ-Tag de Waters.

Cada aminoácido se identifica a partir del tiempo de retención de los estándares en la corrida cromatográfica con un flujo de 1 mL/min, y su concentración se calcula a partir de método de estándar interno (ácido alfa-aminobutírico 2,5 mM). A partir de las concentraciones de aminoácidos y la composición del péptido, se obtiene la concentración empleando el software Empower 2 (Waters Corp.).

Ecuación 4: Eficiencia de funcionalización

$$\text{Eficiencia de funcionalización} = \frac{\text{Concentración de péptido calculada}}{\text{Cantidad de maleimida superficial}} \times 100$$

3.2.3.10 Pruebas de pre-estabilidad de las nanopartículas lipídicas

Para evaluar la pre-estabilidad de la suspensión de nanopartículas se dividió el lote en distintos eppendorfs y se almacenaron en tres condiciones de temperatura: temperatura ambiente, refrigeración (4,0 °C) y congelación (-20,0 °C). Las muestras se analizaron a tiempo cero, y se dio seguimiento cada semana durante 4 semanas, analizando tamaño de partícula, potencial zeta y eficiencia de encapsulación.

3.2.4 Ensayos biológicos

3.2.4.1 Manejo y cultivo de las diferentes líneas celulares

3.2.4.1.1 Cultivo celular HEK 293T

La línea HEK 293T es una sublínea celular inmortalizada generada a partir de células humanas embrionarias de riñón que se utiliza ampliamente como modelo para estudios de toxicidad en nanopartículas (563).

Para su mantenimiento, estas células se cultivan a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂ (Incubador ThermoForma, Modelo 311. ThermoScientific). El medio para cultivo de estas células se prepara a partir de DMEM bajo en glucosa (Dulbecco's Modified Eagle Medium), que cuenta con una concentración de glucosa 1 g/L (Gibco). Este medio se suplementa con suero fetal bovino (FBS) en una concentración del 10% (v/v) (Gibco), L-Glutamina a 4 mM (Gibco) y penicilina/estreptomicina a 100 U y 0,1 mg/mL respectivamente.

Las células se mantienen 48 horas en cultivo en una placa P100, tiempo en el que alcanzan una confluencia del 80-90%. Para poder mantener estas células en cultivo una vez alcanzada esta confluencia es necesario realizar un pase a una placa nueva. El procedimiento para realizar el pase celular consiste en aspirar el medio, y a continuación lavar la placa P100 con 1-2 mL de PBS 1X. Luego se desprenden las células empleando 2 mL de una solución preparada con tripsina-EDTA al 0,05% en una dilución 1:3 en PBS 1X e incubando 3 minutos a 37 °C.

Una vez desprendidas las células, se inactiva la tripsina con 4 mL de medio DMEM bajo en glucosa. De la suspensión celular resultante, se toma 1 mL y se transfiere a una (o varias) placas

P100 a la que previamente se le han añadido 9 mL de medio de cultivo. Finalmente, se incuban de nuevo durante 48 horas o hasta que alcancen la confluencia necesaria para realizar el experimento correspondiente.

3.2.4.1.2 Cultivo celular SH-SY5Y

La línea celular SH-SY5Y es una línea celular inmortalizada derivada de un neuroblastoma humano muy empleada como modelo de neuronas humanas inmaduras para el estudio del sistema nervioso y enfermedades neurodegenerativas (564,565). Estas células se cultivan a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂ empleando como medio de cultivo DMEM alto en glucosa (concentración de glucosa de 4,5 g/L), suplementado con FBS a una concentración 10% (v/v) de FBS (Gibco) y penicilina/estreptomicina a 100 U y 1 mg/mL respectivamente.

De igual manera que se describió en la sección 3.2.4.1.1, las células se mantienen en cultivo 48 horas, tiempo tras el cual alcanzan una confluencia del 80-90%. Pasado este periodo, se realiza el pase celular para mantenerlas en cultivo. Para ello se aspira el medio, se lava con 1-2 mL de PBS 1X. Luego se desprenden las células empleando 2 mL de una solución preparada con tripsina-EDTA al 0,05% en una dilución 1:3 en PBS 1X e incubando 3 minutos a 37 °C. Tras ello, se inactiva la tripsina con 3 mL de medio DMEM con alto contenido en glucosa.

El volumen de suspensión celular obtenida (5 mL) se pasan a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugan a 1500 rpm durante 3 minutos. Después de la centrifugación, se aspira el sobrenadante, y el precipitado se resuspende en medio DMEM con alto contenido en glucosa. Luego, se agrega 1 mL de suspensión celular en una nueva P100, a la que previamente se han añadido 9 mL de medio DMEM con contenido alto en glucosa. Las células se cultivan hasta alcanzar una confluencia del 80-90% y requieran un nuevo pase celular o hasta que alcancen la confluencia necesaria para emplearlas en el experimento correspondiente.

3.2.4.1.3 Cultivo celular hCMEC/D3

La línea celular hCMEC/D3 es una línea celular endotelial inmortalizada derivada de microvasos del lóbulo temporal humano, y empleada como modelo para la BHE para diversas aplicaciones biomédicas (566,567). En el contexto de esta investigación se emplea para evaluar la capacidad de las nanopartículas para penetrar líneas celulares de barrera.

El medio de cultivo empleado para las hCMEC/D3 es el EndoGRO™-MV (Sigma Aldrich), suplementado con factor de crecimiento epidérmico (rh EGF, Thermo Scientific) a una concentración de 5 ng/mL, L-Glutamina (Sigma Aldrich) a una concentración de 10 mM, hidrocortisona hemisuccinato a 1 µg/mL, heparin sulfato a 0,75 U/mL, ácido ascórbico a 50 µg/mL y FBS al 5% (v/v). De igual manera que se describió en la sección 3.2.4.1.1, las células se mantienen en cultivo 48 horas, tiempo tras el cual alcanzan una confluencia del 80-90%. Pasado este periodo, se realiza el pase celular para mantenerlas en cultivo. Para ello se aspira el medio, se lava con 1-2 mL de PBS 1X. Luego se desprenden las células empleando 2 mL de tripsina-EDTA al 0,25% e incubando 5 minutos a 37°C. Posteriormente se inactiva la tripsina empleando 6 mL de medio de cultivo.

Los 8 mL de suspensión de células resultantes se transfieren a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugan 5 minutos a 1230 rpm. Luego de aspirar el sobrenadante, el precipitado se resuspende en medio EndoGRO™-MV y se transfiere 1 mL de la suspensión celular en una nueva placa P100 que previamente ha sido tratada con colágeno de cola de rata de tipo I (Fisher

Scientific) a una concentración de 50 µg/mL durante 1 hora a 37 °C y a la que se le han añadido 9 mL de medio EndoGROTM-MV. Estas células se cultivan a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂. Las células se cultivan hasta alcanzar una confluencia del 80-90% y requieran un nuevo pase celular o hasta que alcancen la confluencia necesaria para emplearlas en el experimento correspondiente.

3.2.4.1.4 Cultivo celular de células endoteliales derivadas de células progenitoras de sangre de cordón umbilical

Para este modelo de BHE se utilizan CE diferenciadas a partir de células CD34+, obtenidas de sangre de cordón umbilical humano. Estas células se obtienen a partir de una colaboración con el “*Blood Brain Barrier Laboratory*”, de la Universidad de Artois, Francia (535). Por lo tanto, estas células se reciben ya aisladas, diferenciadas a EC y congeladas. Al ser células primarias, no es posible mantenerlas en cultivo más de 20 días.

Para su uso se añaden 10 mL de gelatina (Sigma) a concentración de 2 mg/mL en una placa P100 y se incuba durante 15 minutos a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, se aspira la gelatina y se añaden 10 mL de medio de cultivo para células endoteliales, suplementado con 25 mL de FBS para BHE inactivado por calor, 2,5 mL de gentamicina (Sigma aldrich) a una concentración de 50 µg/mL y 5 mL de suplementos de crecimiento para células endoteliales (ECGS) (Sigma Aldrich). A continuación, se descongela el vial de células endoteliales primarias en el baño a 37 °C, sin dejar el vial más tiempo del necesario para descongelar. Se vierte todo el contenido del vial en la placa P100 previamente acondicionada y se incuba durante 3 horas a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂. Pasado este periodo, se aspira el medio, se cambia por otros 10 mL de medio de cultivo para células endoteliales suplementado y se continúa incubando durante varios días hasta que alcancen una confluencia del 90% y sean empleadas en los ensayos *in vitro* de BHE.

3.2.4.1.5 Cultivo celular de pericitos

Los pericitos empleados son una línea celular inmortalizada de pericitos de origen bovino obtenida también a partir de la misma colaboración que las EC descritas en el punto anterior. Para su uso, se prepara el medio de cultivo con DMEM con contenido bajo en glucosa sólido, al que se añade 1 L de H₂O y 2 g de NaHCO₃ y se ajusta su pH a 6,8 usando HCl 6M. Posteriormente, se filtran 200 mL del medio y se suplementa con 50 mL de FBS para BHE, 1,25 mL de gentamicina y 2,5 mL de L-Glutamina 200 mM.

Una vez preparado el medio, se trata una placa P100 con 10 mL de gelatina a una concentración de 2 mg/mL y se incuba durante 15 minutos a 37 °C. Tras la incubación, se aspira la gelatina y se añaden 10 mL del medio para pericitos preparado anteriormente. A continuación, se descongela el vial de pericitos en el baño a 37 °C, sin dejar el vial más tiempo del necesario para descongelar. Por lo tanto, lo más rápido posible, se plaquea todo el contenido del vial en la placa P100 preparada anteriormente y se incuba durante 3 horas a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂. Tras la incubación, se cambia el medio y se incuban a 37 °C hasta que alcancen un 90% de confluencia y sean empleados en los ensayos *in vitro* de BHE.

3.2.4.2 Evaluación de la viabilidad celular

Para la evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas, se cultivaron células HEK 293T en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente un 70–80%. Posteriormente, a cada pocillo se agregaron diferentes volúmenes de suspensión de

nanopartículas (0, 10, 30, 50, 100, 200 y 300 μL) a dos concentraciones diferentes: la concentración original de la fórmula prototipo y una dilución 1:8 en PBS 1X. Las células se incubaron con las nanopartículas durante 4 horas a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO_2 . Tras esas 4 horas iniciales se agregan 200 μL de FBS y se continúa con la incubación hasta 24 horas. Al finalizar, se realizaron observaciones con el microscopio óptico para evaluar la densidad celular, el color del medio y la morfología celular.

3.2.4.3 Evaluación de la internalización de nanopartículas a través de microscopía confocal

Esta técnica permite obtener imágenes de fluorescencia con alto contraste debido a su capacidad de seccionamiento óptico. En esta técnica se bloquea la luz proveniente de la sección fuera de foco resultando en una imagen clara de la zona focal. Su capacidad para realizar “cortes” en la muestra permite investigar la ubicación espacial de las moléculas fluorescentes (ver Figura 27). También es posible realizar una serie de cortes confocales que permiten una reconstrucción 3D tridimensional de las muestras observadas (568–570).

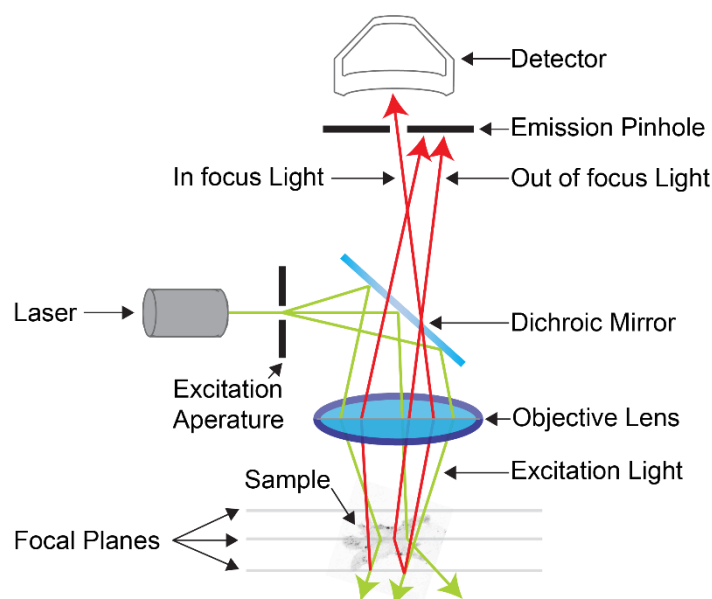


Figura 27: Representación de la estructura y funcionamiento de un microscopio confocal

El espejo dichroico refleja la muestra a través del lente objetivo hacia los diferentes planos focales de la muestra. Posteriormente, la luz emitida por la muestra en diferentes direcciones debe atravesar una ranura confocal (o *pinhole*) que bloquea la luz fuera de foco, y permite el paso hacia el detector únicamente de la luz proveniente del punto de interés. Imagen modificada de (568).

Para la observación de la internalización de nanopartículas lipídicas mediante microscopía confocal, las células se cultivaron sobre lentillas de vidrio borosilicato colocadas en placas de 6 pocillos hasta una confluencia aproximada de 30 al 40%. Las células HEK 293T y células hCMEC/D3 se cultivaron sobre lentillas de 12 mm de diámetro, y células SH-SY5Y sobre lentillas de 18 mm de diámetro.

Después de la siembra, las células se incubaron a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO_2 durante toda la noche. Seguidamente, se añadieron 10, 20 y 30 μL de suspensión de nanopartículas sobre los pocillos que contenían las lentillas y se incubaron durante 1 hora a 37°C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO_2 .

Después de esta incubación se retiraron las lentillas cuidadosamente, y se procedió a fijar las células utilizando paraformaldehído al 4% en PBS 1X a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de la fijación, se realizaron 3 lavados en PBS 1X y se montaron las

preparaciones usando Prolong Gold Antifade DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) como medio de montaje.

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio espectral confocal SP8 (Leica) en modo secuencial. Para visualización del fluoróforo Cy5, presente en las nanopartículas lipídicas, se empleó una excitación con láser blanco a 580 nm, y un detector híbrido en el rango de 652-679 nm. Para la visualización del marcaje nuclear con DAPI se empleó una excitación con diodo a 405 nm y un detector en el rango de 439-447 nm. Se empleó el modo de trabajo de superresolución Hyvolution, con un objetivo de 63x, un tamaño de pixel de 51 nm y un diámetro de ranura confocal (pinhole) de 67,3 μm . Las imágenes obtenidas se analizaron con el software Las AF (Leica) y se procesaron con los programas ImageJ (Fiji) y Adobe Photoshop CS3 v10.0.

3.2.4.4 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología que permite contar y clasificar las células de una muestra según tamaño, forma y propiedades de fluorescencia. Este proceso se lleva a cabo en un dispositivo donde las células en suspensión son iluminadas por un láser. La luz dispersada y la fluorescencia emitida son detectadas por fotodiodos o fotomultiplicadores que capturan y amplifican las señales. Es una herramienta rápida con aplicaciones en campos como la inmunología, biología molecular, bacteriología, virología, biología del cáncer y en el monitoreo de enfermedades infecciosas (571,572).

Para los análisis de citometría de flujo, se sembraron 9×10^4 células HEK 293T por pocillo en placas de 6 pocillos y, cuando alcanzaron aproximadamente un 40% de confluencia (alrededor de 16 horas después de la siembra), se incubaron con 10, 30 y 50 μL de suspensión de nanopartículas. Las células y nanopartículas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO_2 . Posterior a la incubación, las células se desprenden agregando 500 μL de solución de tripsina e incubando 2 o 3 minutos a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO_2 .

La muestra se centrifuga a 37 °C a 1600 rpm durante 3 minutos, se elimina el sobrenadante por decantación, se agrega 1 mL de PBS 1X y se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones. Al precipitado se le agrega 200 μL de paraformaldehído al 4% y tras una ligera agitación, se mantiene a 4 °C durante 30 minutos. Cuando pasan los 30 minutos se agrega 1 mL de PBS 1X, se centrifuga a 37 °C a 1600 rpm durante 3 minutos, y el precipitado se resuspende en 250 μL de PBS 1X. La resuspensión celular se lleva a un tubo de ensayo de poliestireno adecuado y se coloca en el puerto de inyección de la muestra del citómetro Citómetro FACSymphony (BD Biosciences) donde se lleva a cabo la excitación y captación de la fluorescencia emitida de las células que pasa por el flujo del citómetro, y el equipo integra los datos para obtener los gráficos de distribución de frecuencia y los histogramas de los análisis por citometría de flujo.

3.2.4.5 Experimentos de silenciamiento génico en células HEK 293T

Para los análisis de la capacidad de silenciamiento de las LNPs se sembraron 9×10^4 células HEK 293T por pocillo en placas de 6 pocillos y, cuando alcanzaron aproximadamente un 40% de confluencia (alrededor de 16 horas después de la siembra), se incubaron con 50 y 100 μL de suspensión de nanopartículas. Esa suspensión de nanopartículas fue previamente diluida para que esas alícuotas correspondieran a 0,05 y 0,10 nanomoles de siTCERG1, calculado a partir de la cantidad teórica de siRNA agregada a la formulación y la eficiencia de encapsulación calculada previamente (sección 3.2.3.6).

Como control positivo para este ensayo se contó con la transfección de células HEK 293T con 0,1 nanomoles de siTCERG1 empleando Lipofectamine 2000, y como control negativo tanto nanopartículas como lipofectamina 2000 transfectando 0,1 nanomoles de siGFP.

Las células se incubaron con las distintas condiciones durante 48 horas a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂ y tras ello se recogieron para el análisis de la expresión de la proteína TCERG1 y la capacidad de silenciamiento mediante qPCR y Western Blot.

3.2.4.6 Análisis de proteínas por Western Blot

El Western Blot es una técnica empleada para la separación por electroforesis en gel de poli(acrilamida) de proteínas presentes en un extracto proteico en función de su peso molecular, y su posterior identificación usando anticuerpos para las proteínas de interés (573,574).

3.2.4.6.1 Extracción de proteínas

El primer paso en un análisis de Western Blot es la extracción de proteínas de la muestra de cultivo celular. Tras aspirar el medio, se agrega 1 mL de PBS 1X y se deprenden las células con ayuda de un raspador de células. La suspensión celular obtenida se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C descartando el sobrenadante. El precipitado se resuspende en 100 µL de tampón de extracción RIPA y se incuba en hielo durante 30 minutos. Tras esa incubación, la muestra se centrifuga nuevamente por 5 minutos, a una velocidad de 14000 rpm y a 4 °C. El sobrenadante obtenido en esta segunda centrifugación contiene las proteínas extraídas.

3.2.4.6.2 Cuantificación del contenido proteico

La concentración de proteína en el extracto se determina mediante el método colorimétrico de Lowry. Para ello se añaden de 5 µL de extracto de proteína a 100 µL de mezcla de los reactivos A+S (BioRad). El reactivo A contiene cobre que, al reaccionar con los enlaces peptídicos de las proteínas, produce cobre ionizado, una etapa conocida como reacción de Biuret. Tras 5 minutos a temperatura ambiente, se añaden 800 µL del reactivo B que contiene fosfomolibdotungstato para desarrollar un complejo azul de heteropolimolibdeno mediante la reacción de Folin (575).

La muestra se incuba por 15 minutos más, en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Para la cuantificación, se transfieren 200 µL de la mezcla de proteínas y reactivos a un pocillo de una placa de 96 pocillos y se mide la concentración de proteína usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm

3.2.4.6.3 Ejecución del Western Blot: Electroforesis, transferencia y detección de proteínas

Las muestras de extracto proteico (3.2.4.4.1) se preparan para la electroforesis mezclándolas con solución SDS 2X y se incuban a 99 °C durante 5 minutos. Posteriormente se cargan en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10% y se someten a electroforesis en la celda Mini transblot® (BioRad) empleando tampón Laemmli 1X, aplicando un voltaje continuo de 150 V hasta completar la separación de las proteínas. Seguidamente, se transfiere el contenido del gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa mediante un sistema húmedo, utilizando una solución amortiguadora de transferencia que contiene 20% v/v de metanol, 25 mM de Tris y 192 mM de glicina. El proceso de transferencia se realiza aplicando un campo eléctrico de 112 V a 4 °C durante 60 minutos.

Tras la transferencia, las membranas se tratan con una solución de bloqueo compuesto por 100 µL de PBS 1X, 5 g de leche desnatada en polvo y 100 µL de Tween 20. Posteriormente se incuban con los anticuerpos primarios dirigidos hacia las proteínas a identificar (por ejemplo, TCERG1 o

GFP) durante 24 horas a 4 °C. Tras la incubación la membrana se lava 3 veces con una solución de Tween 20 al 0,1% en PBS, por agitación, con una duración de 10 minutos por lavado. Luego se incuba la membrana con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez finalizada la segunda incubación, se repite el proceso de lavado de la membrana con Tween 20 al 0,1% en PBS.

Finalmente, la membrana se pone en contacto con la mezcla de revelado preparada a partes iguales Western Lightning® Plus ECL Oxidizing Reagent y Western Lightning® Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus, aplicando 1 mL de mezcla de revelado por membrana. La muestra de revelado se deja actuar por un minuto y se procede a la detección de las proteínas por quimioluminiscencia, utilizando el equipo de revelado CURIX 60 (Agfa).

3.2.4.7 Análisis de expresión génica por reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR)

La qPCR es una técnica que permite la amplificación selectiva y cuantificación en tiempo real de fragmentos específicos de DNA, obtenido a partir del mRNA presente en las células y su transformación a cDNA. Esta técnica logra una replicación exponencial del contenido de DNA en una muestra mediante ciclos repetitivos de calentamiento y enfriamiento. En cada ciclo, un marcador fluorescente se une al material amplificado permitiendo una medición de la cantidad amplificada, que correlaciona con la cantidad original de DNA en la muestra (576).

3.2.4.7.1 Extracción de RNA

La extracción del RNA de la muestra del cultivo celular se realiza con el método del TRIzol. Tras aspirar el medio, se agrega 1 mL de PBS 1X y se dependen las células con ayuda de un raspador de células. La suspensión celular obtenida se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C descartando el sobrenadante. Posteriormente se añaden 400 µL de TRIzol al precipitado celular y se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se añaden 80 µL de cloroformo, se agita por inversión y se deja reposar por otros 5 minutos.

Pasado ese tiempo de reposo, se centrifuga la muestra a 11800 rpm y 4 °C durante 15 minutos. Se recupera cuidadosamente la fase acuosa y se le añade isopropanol frío en proporción de volumen 1:1, incubando la mezcla 10 minutos a temperatura ambiente. Tras una nueva centrifugación a 11800 rpm por 10 minutos y 4 °C, se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado con 1 mL de etanol al 75%. Esta muestra se vuelve a centrifugar a 10400 rpm durante 10 minutos y 4 °C, y se descarta el sobrenadante. El precipitado se deja secar por al menos 10 minutos a temperatura ambiente, y finalmente se resuspende en 15 µL de agua libre de RNAasas y se incuba a 58 °C por 10 minutos.

3.2.4.7.2 Conversión del RNA en cDNA y determinación de la concentración

Para la conversión de RNA a DNA complementario (cDNA), se añaden 2 µL de 5X PrimerScript RT Master Mix (Takara Bio Europe) a 500 ng de RNA, y se ajusta el volumen a 10 µL con agua Mili-Q. La mezcla se incuba a 37 °C por 15 minutos, y luego a 85 °C durante 5 segundos. Posteriormente, la concentración de cDNA se mide utilizando 1 µL de la muestra en el espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop® (ProdigyScientific) a una longitud de onda de 260, además de mediciones a 230 y 280 nm como medidas secundarias para estimación de la pureza del cDNA.

3.2.4.7.3 qPCR en tiempo real

La preparación de las muestras para qPCR parten de una dilución 1:5 de la muestra de cDNA empleando agua Mili-Q. Se colocan 4 µL de esa dilución en un pocillo de una placa de 96 pocillos y se le agrega 6 µL de una mezcla para PCR que incluye: 0,5 µL de *primer forward*, 0,5 µL de *primer reverse* y 5 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Biorad). Una vez cargada la placa, se introduce en el termociclador CFX96 Real-Time PCR Detection System para proceder con la amplificación permitiendo obtener el porcentaje de eficiencia de la reacción a partir de la curva de amplificación.

Cada análisis se repite al menos tres veces, y se incluye siempre un control interno para medir la expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La cuantificación de la expresión génica se realiza empleando el método de Pfaffl (577):

Ecuación 5: Ecuación de Pfaffl

$$\text{Expresión relativa gen} = \frac{E_{\text{gen experimental}}^{\Delta C_T \text{ gen experimental}}}{E_{\text{GAPDH}}^{\Delta C_T \text{ GAPDH}}}$$

Donde $E_{\text{gen experimental}}$ y E_{GAPDH} se refieren a la eficiencia de la reacción de qPCR del gen experimental y GAPDH, respectivamente, y ΔC_T se refiere a la diferencia del umbral de ciclos de amplificación entre el gen experimental y GAPDH.

3.2.4.8 Modelo *in vitro* de BHE

Este modelo *in vitro* consiste en un co-cultivo de células endoteliales derivadas de células progenitoras de sangre de cordón umbilical y pericitos. Los pericitos se emplean en este co-cultivo por su capacidad para inducir las propiedades de BHE en las células endoteliales.

3.2.4.8.1 Preparación del co-cultivo

De forma previa, las células endoteliales y los pericitos se cultivan hasta que alcancen la confluencia, de acuerdo con los procedimientos descritos en las secciones 3.2.4.1.4 y 3.2.4.1.5. Llegado a este punto, se transfieren a placas de 12 pocillos debidamente acondicionadas para cada línea celular.

Para los pericitos, se debe acondicionar una placa de 12 pocillos de forma que, en cada pocillo, se añade 1 mL de gelatina y se incuba durante 15 minutos a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂. Tras la incubación, se aspira la gelatina y se añade 1,5 mL de medio para pericitos. Para las células endoteliales se deben pretratar filtros *transwell* con Matrigel®. Para ello, los filtros *transwell* se colocan dentro de placas de 12 pocillos y se les agrega 500 µL de Matrigel® (Corning) diluido 48 veces en DMEM bajo en glucosa y se incuban durante 1 hora a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂. Posteriormente se aspira el DMEM de cada pocillo y se agregan 500 µL de medio para células endoteliales.

Se toma la placa que contiene el cultivo de pericitos y se aspira el medio. Las células se lavan con PBS 1X y para desprenderlas se agrega 1 mL de tripsina-EDTA al 0,5% e incubando 2 minutos a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂. Tras la incubación, se añaden 5 mL de medio para pericitos para inactivar la tripsina, se resuspenden las células (con cuidado de asegurar una suspensión uniforme) para proceder a contarlas empleando una cámara de conteo de Neubauer (363,364). Se toma un volumen correspondiente a 50000 células y se transfiere a cada uno de los pocillos pretratados con gelatina, se incuban por 3 horas a 37 °C en atmósfera

del 95% de humedad y 5% de CO₂. Transcurridas las 3 horas se aspira el medio para pericitos y se cambia por 1,5 mL para células endoteliales.

En el caso de la placa que contiene el cultivo de células endoteliales se realiza un procedimiento similar para obtener la suspensión de células: se aspira el medio de la placa P100, se lavan con 10 mL de PBS 1X y se desprenden con 1 mL de tripsina-EDTA al 0,5% para incubar a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂. En el caso de esta línea celular, esta incubación es por el plazo de una hora, una vez transcurrida se inactiva la tripsina con 4 mL de medio de cultivo para células endoteliales. Las células se resuspenden bien (con cuidado de asegurar una suspensión uniforme), para proceder a contarlas empleando una cámara de contaje de Neubauer (578,579) y se determina el volumen de suspensión correspondiente a 80000 células.

Paralelamente, los filtros *transwell* pretratados con Matrigel® deben ser cuidadosamente transferidos, con la ayuda de una pinza, a cada uno de los pocillos de la placa de 12 pocillos donde se sembraron los 50000 pericitos por pocillo. A cada uno de esos pocillos, sobre el filtro *transwell*, se debe transferir el volumen de suspensión de células endoteliales correspondiente a 80000 células. Este co-cultivo se mantiene en incubación a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂. Se cambia el medio después de 48 horas, y 120 horas de establecido el co-cultivo. Una figura representativa del co-cultivo de células endoteliales y pericitos en un filtro *transwell* se muestra en la Figura 28.

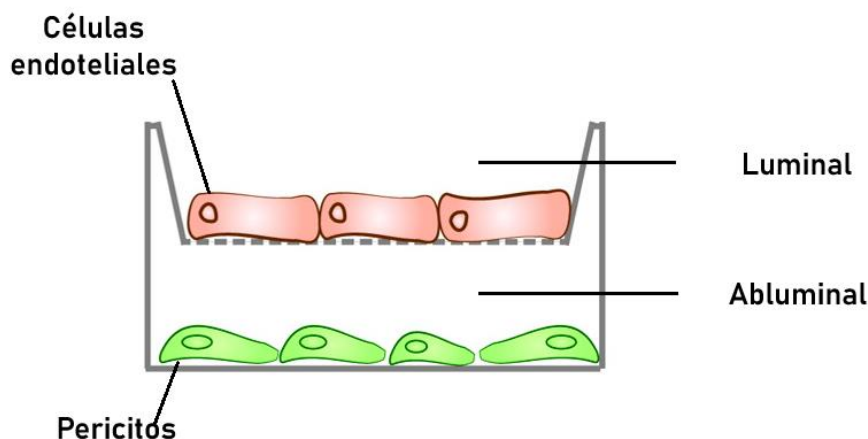


Figura 28: Representación del modelo *in vitro* de BHE

El cultivo de células endoteliales sobre filtros *transwell* colocados sobre un pocillo en el que se han cultivado los pericitos, establece el co-cultivo que corresponde modelo *in vitro* para evaluar la permeabilidad a través de la BHE. Imagen modificada de (140).

3.2.4.8.2 Ejecución del ensayo

El ensayo se ejecuta 7 u 8 días después de la siembra del co-cultivo. Antes de empezar, los filtros y los pocillos se lavan con Ringer Hepes (HEPES 5mM, NaCl 150 mM, KCl 5,2 mM, CaCl₂ 2,2 mM, MgCl₂ 0,2 mM, NaHCO₃ 6 mM y 2,8 mM de glucosa) durante 15 minutos a 37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂, y se añade a cada pocillo 1,5 mL de Ringer Hepes o medio de cultivo para células endoteliales sin rojo fenol, además de una muestra de 500 uL de la suspensión de nanopartícula lipídicas a ensayar. Cada muestra se determina por triplicado. Adicionalmente a las muestras se emplea un control de permeabilidad de *Lucifer yellow*.

Tras un periodo de 2 horas de incubación (37 °C en atmósfera del 95% de humedad y 5% de CO₂) se recolectan 500 µL del aceptor, que corresponde al fondo del pocillo y que representa la parte abluminal de la barrera, y se recolectan también los 1,5 mL de dador, que corresponden a la parte superior del filtro y representan el lado luminal de la barrera. Las muestras se guardan a 4 °C y protegidas de la luz.

Para el análisis de resultados se toman 100 µL de cada aceptor en una placa de 96 pocillos. Adicionalmente se prepara un pocillo con 10 µL de la suspensión de nanopartícula y 90 µL de Ringer Hepes o medio de cultivo para células endoteliales sin rojo fenol, medición que se considera como valor a tiempo 0 del ensayo (t'0). Se procede a determinar la emisión fluorescente del t'0 y de cada uno de los aceptores con el lector de placas Infinite F200 (Tecan), configurado con una longitud de onda de excitación de 651 nm y 670 nm de emisión.

El resultado del ensayo de permeabilidad se obtiene con el cálculo de la permeabilidad aparente (P_{app}) en cm/s a partir de la Ecuación 6.

Ecuación 6: Permeabilidad aparente

$$P_{app} = \frac{QA(t) \cdot VD}{t \cdot A \cdot QD \cdot t'0}$$

Donde QA (t) corresponde a la cantidad de compuesto presente en el aceptor a un tiempo t; VD es el volumen del dador; t es el tiempo en segundos; A es el área de la membrana en cm² y QD (t0) es la cantidad de compuesto presente en el dador al inicio del ensayo. El valor de control de P_{app} para el Lucifer Yellow debe de ser <15x10⁶ cm/s para que sea significativo de la correcta formación y función de barrera, y que el ensayo se considere como válido.

3.2.4.9 Modelo *in vivo*

Para los ensayos de detección y biodistribución de nanopartículas lipídicas en modelo animal se emplearon ratones cb17-SCID de 6-8 semanas. Hasta el momento de la experimentación, los animales se criaron en jaulas de plástico en grupo de varios individuos, acorde al comportamiento social de la especie. Estas jaulas estaban colocadas en estantes ventilados, en condiciones de temperatura de 20-24°C, humedad del 55+/-10°C y con periodos de 12h de luz y 12h de oscuridad, de acuerdo con las normas de bienestar animal.

El modelo *in vivo* se aplicó en tres ensayos diferentes. Los dos primeros se enfocaron en la puesta a punto del método, determinado dosis óptimas de nanopartículas y los tiempos de observación. El tercer análisis correspondió a la evaluación propiamente del comportamiento de las nanopartículas funcionalizadas.

En cuanto a las dosis de nanopartículas administradas, se emplearon varias diluciones a partir de la concentración inicial obtenida tras la fabricación del prototipo: 1X; 0,5X; 0,25X y 0,125X. La fórmula empleada para la fabricación de estas nanopartículas incluía además 1,5% del lípido fluorescente (DSPE-mPEG-Cy5), tal como se indicó en la sección 3.2.1.2.

Todas las diluciones se prepararon utilizando PBS 1X. La administración de 100 µL de cada dosis se realizó por vía intravenosa a través de la cola de los ratones. Antes de la administración, cada dosis se filtró utilizando filtros esterilizantes de 0,2 µm de diámetro de poro para asegurar la seguridad de la solución. Cada ensayo incluyó además un grupo de ratones control. La Tabla 13 detalla el esquema de dosificación y el manejo de los animales durante los experimentos.

Tabla 13: Esquema de dosis y manejo de ratones empleados para los estudios de biodistribución en el modelo *in vivo* de las nanopartículas lipídicas.

Dosis	Ensayo	Ratón Id	Sexo	Sacrificio	Funcionalización	Perfusión
1X	1	1,2	Hembra	8h	Sin funcionalizar	No
	1	1,6	Hembra	24h		No
0,5X	1	1,1	Hembra	8h	Sin funcionalizar	No
	1	1,5	Hembra	24h		No
	2	2,7	Hembra	2h		Sí
	2	2,8	Hembra	6h		Sí
	2	2,9	Hembra	24h		Sí
0,25X	2	2,4	Hembra	2h	Sin funcionalizar	Sí
	2	2,5	Hembra	6h		Sí
	2	2,6	Hembra	24h		Sí
0,125X	2	2,1	Hembra	2h	Sin funcionalizar	Sí
	2	2,2	Hembra	6h		Sí
	2	2,3	Hembra	24h		Sí
0,25X	3	3,1	Hembra	6h	RVG	Sí
	3	3,2	Hembra	6h		Sí
	3	3,3	Hembra	24h		Sí
	3	3,4	Hembra	6h	MiniAp-4	Sí
	3	3,5	Hembra	6h		Sí
	3	3,6	Hembra	24h		Sí
	3	3,7	Hembra	6h	Cisteína (control)	Sí
	3	3,8	Hembra	6h		Sí
	3	3,9	Hembra	24h		Sí
Control (sin LNPs)	1	1,3	Hembra	8h	Sin funcionalizar	No
	1	1,6	Hembra	24h		No
	2	2,11	Macho	2h		Sí
	2	2,12	Macho	6h	Sin funcionalizar	Sí
	2	2,10	Hembra	24h		Sí
	3	3,10	Hembra	6h		Si
	3	3,11	Hembra	24h		Si

Posterior a la administración de las dosis en cada animal, se realizó un seguimiento a tiempo real *in vivo* empleando el sistema IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (Revvity), con el fin de monitorear la biodistribución de las nanopartículas. Las imágenes se capturaron a diferentes intervalos de tiempo: 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas y 24 horas post-administración.

Adicionalmente, la distribución de las nanopartículas en los órganos se evaluó de forma *ex vivo*. Los ratones empleados para el seguimiento *in vivo* fueron sacrificados en tiempos específicos: 2, 6, 8 y 24 horas post-administración. A partir del ensayo número dos, el sacrificio del animal se realizó después de realizar una perfusión con PBS 1X para eliminar cualquier residuo sanguíneo. Para este procedimiento, se procedió a anestesiarse a los ratones mediante inyección de pentobarbital a una dosis de 100 mg/Kg. Posteriormente, se realizó una incisión en forma de "V" en el abdomen para acceder a la cavidad abdominal y torácica. Se inyectaron 20 mL de PBS 1X directamente en el ventrículo izquierdo para purgar la sangre. Tras completar la perfusión,

se extrajeron órganos críticos como el hígado, estómago, intestinos, riñones, vejiga, bazo, corazón y cerebro para su posterior análisis empleando el mismo sistema de imagenología.

El procesamiento y análisis de las imágenes se efectuó empleando el software Living Image 4.7.4 y se procesaron los datos utilizando Microsoft Office Excel®. Con la intensidad de fluorescencia de los órganos, se procedió a calcular la acumulación relativa en cerebro en función de la acumulación en otros órganos.

Para el análisis y comparación de los datos en los experimentos de biodistribución de nanopartículas funcionalizadas se calculó la fluorescencia corregida, según lo indicado en la Ecuación 7. Este cálculo se realizó a partir de los datos de la eficiencia de emisión radiante obtenidos durante el análisis *in vivo* o *ex vivo*, obtenidos mediante el uso del software Living Image. Además, se consideró el valor inicial de la fluorescencia de las muestras de nanopartículas antes de su administración.

Ecuación 7: Intensidad de fluorescencia corregida (ifc)

$$ifc = \frac{\text{Intensidad de flouresencia de la imagen analizada}}{\text{flouresencia de la solución de nanopartículas funcionalizadas}}$$

3.3 Consideraciones metodológicas adicionales

3.3.1 Diseño de experimentos y configuraciones experimentales adicionales

Las metodologías de fabricación y funcionalización detalladas en las secciones anteriores ofrecen una amplia gama de posibles combinaciones de factores y niveles. Para explorar estas variables de forma sistemática se utilizó Diseño de Experimentos (DoE) estructurados para recolectar y analizar algunos de los datos, así como otras pruebas y configuraciones experimentales adicionales que complementaron el análisis de los diversos factores y sus efectos e interacciones. De forma combinada se facilitó un mayor entendimiento de las interacciones entre variables, ampliando el conocimiento del espacio de diseño, en línea con los principios de Calidad por Diseño (381,385,388).

3.3.1.1 Diseño de experimentos (DoE)

Para las variables que se estudiaron a través de DoE formales, estos se generaron y analizaron mediante el software Minitab® versión 21.4.3, guiando la exploración y modelación del espacio del diseño. Diferentes diseños se establecieron para evaluar los efectos de cambiar la proporción de componentes lipídicos y así seleccionar los valores de flujo total y proporción de flujo que optimizaran el tamaño de partícula, PDI y potencial zeta. También se generaron estudios de superficie balanceados para guiar el estudio de la disponibilidad de maleimida libre para su funcionalización.

3.3.1.1.1 DoE de formulación

Para estudiar los efectos de la composición cuantitativa de la fase lipídica de la formulación en los atributos de calidad críticos (CQAs), se generaron dos diferentes DoE de mezcla de vértices extremos. El primero correspondió a un diseño grado 2 con 4 componentes y 58 puntos de diseño, en el que se evaluó el efecto de cambios en la mezcla de componentes en el tamaño de partícula, PDI y potencial zeta. El segundo correspondió a un diseño grado 1 con 4 componentes y 17 puntos de diseño, donde se estudió el efecto de la mezcla de componentes en la eficiencia

de encapsulación del RNA. Los valores límite para cada componente de la mezcla se establecieron según lo indicado en la Tabla 14, y las combinaciones evaluadas se detalla en la Tabla A 3, Anexo 1.

Tabla 14: Límites para componentes en los diseños de experimentos de mezcla.

Componentes	Límites en el diseño (%)	
	Inferior	Superior
DSPE-mPEG-2000	1,00	2,00
DSPC	5,00	20,00
Colesterol	20,00	74,00
Dlin-MC3-DMA	20,00	74,00

3.3.1.1.2 DoE de proceso

Para evaluar los efectos de los parámetros críticos de proceso más típicos en la fabricación microfluídica en los CQAs, se estableció un diseño compuesto central de experimentos de superficie de respuesta, que modeló la influencia de las variables de operación seleccionadas según lo indicado en la Tabla 15. El diseño experimental consistió en 1 bloque base y 22 corridas base en 3 réplicas, para un total de 66 corridas en 3 bloques: 24 puntos cúbicos, 24 puntos axiales y 18 puntos centrales. Cuando fue necesario, se aplicaron transformaciones de Johnson a los datos que no presentaban una distribución normal.

Tabla 15: Factores evaluados en el DoE de condiciones de fabricación

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
Flujo total	400	2200	4000
Proporción de flujo	3	3	9
Díálisis	No		Sí

3.3.1.1.3 DoE para la incorporación de Maleimida

El estudio del contenido de maleimida, su distribución en la formulación y disponibilidad superficial se estudió a partir de un diseño factorial de 2 factores, y tres niveles: tipo de lípido maleimida (DSPE-mPEG-Maleimida, DSPE -Maleimida y Colesterol-mPEG-Maleimida) y contenido (3%, 6% y 9%) en un diseño de 1 bloque, 1 repetición y 9 corridas.

3.3.1.2 Configuraciones experimentales adicionales

Además de los DoE formales expuestos anteriormente, se evaluaron varios otros factores experimentales que influyen en el desempeño y características de las nanopartículas. En estos otros casos, aunque las configuraciones experimentales no se enmarcaron en un DoE formal, su selección y estudio independiente se dio de forma cuidadosa y seleccionada para que también proporcionara información valiosa sobre la variabilidad y el comportamiento del sistema

nanopartícula bajo diferentes condiciones experimentales. La Tabla 16 muestra los otros factores evaluados, los niveles explorados y las variables de respuesta involucradas en las configuraciones experimentales.

Tabla 16: Factores experimentales y variables de respuesta evaluadas con diseños experimentales adicionales

Factor	Niveles	Variables de respuesta
Concentración lípidos totales	2,5 – 25	Tamaño de partícula, PDI, potencial zeta y eficiencia de encapsulación
Tipo de lípido	DOTAP y Dlin-MC3-DMA	Tamaño de partícula, PDI, potencial zeta y eficiencia de encapsulación
Tampón fabricación	Agua, Citrato (0,0015 y 5 mM)	Tamaño de partícula, PDI, potencial zeta
Tampón purificación	Agua, KCl 0,1 mM, PBS1X, sin diálisis	Tamaño de partícula, PDI, potencial zeta
TF	1000, 2000 y 5000	Eficiencia de encapsulación
FRR	3, 5 y 9	Eficiencia de encapsulación
pH funcionalización	<7; 7,4 y >8	Eficiencia de funcionalización
Tiempo incubación	20, 40 y 60 minutos	Maleimida residual en la formulación
Proporción lípido maleimida a péptido	1:0,5; 1:1; 1:1,25 y 1:1,5	Maleimida residual en la formulación
Efecto de evitar la primera diálisis	Sí o no	Maleimida residual en la formulación
Tipo de péptido	RVG, THRre, Angiopepe2, MiniAp-4, Cisteína*	Tamaño de partícula, PDI, potencial zeta Eficiencia de funcionalización, estudio de permeabilidad <i>in vitro</i> a través de la BHE, y estudio de distribución <i>in vivo</i>

Nota: *Para la eficiencia de funcionalización únicamente se evaluaron RVG, Angiopep2 y THRre, mientras que para evaluar la permeabilidad *in vivo* únicamente se estudiaron RVG, MiniAp-4 y cisteína

3.3.2 Análisis estadístico de los datos

Todos los datos obtenidos en el estudio se analizaron utilizando el software estadístico Minitab® 21.4.3, empleando también Microsoft Excel® para el tratamiento de los datos. Este análisis estadístico permitió evaluar la significancia y la variabilidad de los datos obtenidos, permitiendo además identificar interacciones y correlaciones que contribuyeron a una mayor comprensión de los efectos de algunos de los factores experimentales. Los resultados promedio se presentan como la media $\pm$ desviación estándar de las mediciones realizadas.

Para la comparación de medias entre grupos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores, según correspondiera, seguido de pruebas post hoc de Tukey para identificar diferencias específicas entre grupos. Se consideraron como estadísticamente significativos los valores de p menores a 0,05, y se indicaron los casos en que se observaron valores de significancia más estrictos, como $p < 0,01$ y $p < 0,001$.

En los diseños experimentales más complejos (3.3.1.1), se empleó análisis de regresión múltiple con evaluación de mínimos cuadrados. De forma complementaria se ejecutó análisis de varianza y análisis de correlación de Pearson. Este enfoque permitió modelar matemáticamente y predecir la configuración óptima de parámetros de acuerdo con objetivos específicos, así como predecir respuestas en escenarios hipotéticos, como por ejemplo en la optimización de tamaño de partícula, PDI y potencial zeta en los DoE de formulación y mezcla de componentes. La bondad de ajuste y la precisión predictiva de los modelos se evaluaron mediante gráficos de residuos y valores r^2 y r^2 predictivo.

Para estos diseñar con múltiples factores y niveles interrelacionados, también se aplicó análisis multivariado, incluyendo análisis de componentes principales (PCA)(580). El PCA permitió una reducción de la dimensionalidad de los datos, permitiendo identificar patrones y establecer (o confirmar) relaciones entre las variables, ayudando a comprender la influencia de los factores en los resultados obtenidos. Adicionalmente, en el caso de los datos obtenidos del diseño experimental de la Tabla 15, se generaron también árboles de clasificación y regresión (CART)[®] (581) para posterior visualización y jerarquización de los niveles de variables más influyentes.

3.3.3 Consideraciones éticas

Los estudios realizados con animales de experimentación contaron con el aval favorable del Comité Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), registrado bajo el código interno 1419/2023 y del órgano habilitado de la Junta de Andalucía. Se llevó a cabo un seguimiento para garantizar el bienestar de los animales empleados. Todos los procedimientos, incluyendo el sacrificio, se llevaron a cabo conforme a las normas vigentes de bienestar animal, buscando siempre minimizar el sufrimiento de los animales, siguiendo cuando fue posible la regla de las 3R (reducir, reutilizar y reciclar). Los experimentos se realizaron bajo la supervisión de los responsables de la Unidad de Experimentación Animal del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (IPBLN-CSIC).

3.3.4 Contribuciones en el desarrollo de las actividades

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con el apoyo práctico de estudiantes de Máster, quienes participaron activamente bajo la supervisión directa y colaboración con el doctorando. Estos estudiantes contribuyeron en la aplicación de técnicas específicas y en preparación de muestras.

- Kevin Valencia Clua: asistió en las pruebas contenido de maleimida empleando el reactivo de Ellman, en la preparación de reactivos para las pruebas de reformulación para agregar lípido maleimida y lípido fluorescente, y en la preparación de muestras para análisis de contenido de péptido por cuantificación de aminoácidos.
- Laura Carrera Rodriguez y Elena Bertolino: participaron en el desarrollo de método HPLC-UV para la cuantificación de componentes lipídicos, en las pruebas de contenido de maleimida empleando el kit fluorimétrico, y en las pruebas de eficiencia de funcionalización.
- Noelia Martínez Martínez: Colaboró en la ejecución de ensayos biológicos, el mantenimiento de líneas celulares, el manejo de muestras y recolección de datos críticos de las pruebas de desempeño biológico.

Adicionalmente se contó con el apoyo de Alejandro Ramírez Troncoso, en colaboración con el grupo de la Dra. Macarena Sánchez Navarro (Desarrollo y evaluación de péptidos transportadores, IPBLN-CSIC) para el desarrollo del co-cultivos del modelo *in vitro* de BHE.

Durante la ejecución de técnicas de microscopía confocal, citometría de flujo y manejo de animales de experimentación en el IPBLN-CSIC, se contó con el apoyo del personal a cargo de los servicios utilizados: María Mercedes Pérez Sánchez-Cañete (citometría), Laura Montosa Hidalgo (microscopía), y Beatriz Ruiz Entrena, Clara Eugenia Sánchez González y Lina María Orrego Zapata (animalario).

3.3.5 Seguridad y manejo de residuos

Se trabajó siguiendo normas generales de seguridad para laboratorios químicos, empleando en todo caso equipo de protección personal adecuado. Para el manejo de residuos de los procesos de formulación se siguió el procedimiento de gestión de residuos especiales de la Universidad de Barcelona (P-Wa-4.4.6/002)(582). Los residuos se clasificaron según las categorías establecidas, de acuerdo con sus características físicas y su peligrosidad, y se desecharon en contenedores adecuados para su tratamiento y disposición final según las disposiciones generales de dicho procedimiento.

El riesgo biológico de las actividades realizadas en esta tesis es de tipo 2. La manipulación de las células se realizó en salas de cultivo celular señalizadas con el símbolo de peligro biológico y dentro de campanas de seguridad de flujo laminar tipo 2. Las medidas de seguridad utilizadas son las incluidas en la memoria de Autorización de Instalación para realizar manipulación con organismos modificados genéticamente (Notificaciones A/ES/08/I-12 y A/ES/08/I-17 para el nivel de seguridad 2). El IPBLN ha sido acreditado por la Dirección General de Relaciones Laborales y Seguridad y Salud Laboral de la Consejería de Empleo (Junta de Andalucía) para el uso de agentes biológicos tipo 2 (RD 664/1997), con número de referencia de expediente 2016/GR/01. Los reactivos útiles generados durante el desarrollo de este proyecto se almacenaron en congeladores a -80°C, ubicados en salas especialmente habilitadas. El resto se eliminó adecuadamente. No se liberaron organismos modificados genéticamente vivos al exterior. La tesis utilizó ratones como modelo animal, que es crucial para el trabajo propuesto y no puede sustituirse por otros métodos. La cría y experimentación de los ratones se realizó en el animalario del IPBLN (Reg. Nº ES-180210000022).

Resultados

4.1 Desarrollo de las nanopartículas lipídicas

4.1.1 Preformulación de las nanopartículas lipídicas

La premisa fundamental para el inicio de este proyecto fue desarrollar una formulación capaz de transportar siRNA a través de la BHE. Por lo tanto, se requería un tipo de vehículo que no solo protegiera el siRNA durante el tránsito, sino que también ofreciera la capacidad de realizar modificaciones superficiales para permitir un direccionamiento activo aprovechando mecanismos de transporte específicos de la BHE hacia el SNC. Además, sin perder de vista criterios regulatorios y farmacotécnicos para la fabricación de medicamentos, era esencial que el vehículo y su proceso de desarrollo fueran escalables. La ejecución del desarrollo bajo los estándares de calidad por diseño (QbD, ICH Q8) establece una base sólida que podría facilitar la viabilidad del proyecto en un contexto de producción industrial.

Apoyados en la experiencia previa del grupo de investigación y en una exhaustiva revisión bibliográfica, se realizaron pruebas preliminares para identificar el vehículo más adecuado para cumplir con las premisas establecidas. La Tabla 17 muestra los resultados preliminares que exploraron diferentes tipos de nanopartículas y métodos de fabricación, de acuerdo con la disponibilidad. Estas pruebas se centraron en demostrar la viabilidad de aplicación, y en evaluar la compatibilidad práctica de cada método y nanopartícula obtenida con los requisitos del proyecto y su potencial para el escalamiento en un contexto industrial.

Tabla 17: Pruebas preliminares de preparación de nanopartículas para la selección del tipo de vehículo y método de fabricación.

Tipo de nanopartícula	Método de fabricación	Tamaño de partícula (nm)	Observaciones
SLNs	Homogenización en caliente	$184,92 \pm 80,16$	Este método es laborioso y requiere varios pasos. En este se aplica estrés térmico y mecánico a los diferentes componentes. Su baja reproducibilidad puede dificultar la escalabilidad. El siRNA se vehiculiza en la superficie de la nanopartícula.
SLNs	Inyección etanol (goteo con jeringa)	$143,71 \pm 34,11$	Es un método rápido y sencillo de aplicar. Con él es posible obtener un rango de tamaños de partícula más estrecho que con el método de homogenización en caliente. El siRNA se vehiculiza en la superficie de la nanopartícula.
LNPs		$127,87 \pm 8,33$	Es un método rápido y sencillo de aplicar. Con él es posible obtener un rango de tamaños de partícula más estrecho que con el método de homogenización en caliente. El siRNA se vehiculiza encapsulado dentro de la nanopartícula.

Basándose en los resultados de las pruebas preliminares se optó por desarrollar nanopartículas lipídicas ionizables (LNPs), compuestas principalmente por colesterol, lípido ionizable, fosfolípido y lípido pegilado. Para su fabricación, se eligió el método de inyección de etanol.

Particularmente se seleccionó el método de fabricación asistido por mezcla microfluídica, por su mayor potencial de parametrización y elevada reproducibilidad. Esta preselección de tipo de vehículo y método de manufactura permitió avanzar hacia la elaboración de un perfil de calidad objetivo detallado. Este paso a su vez permitió una selección sistemática y justificada de atributos de calidad, así como la implementación de un análisis de riesgo detallado. Este proceso, guiado por los principios de QbD, se detalla en la continuación.

4.1.1.1 Establecimiento del perfil de calidad objetivo de producto

El perfil de calidad objetivo del producto (QTP) se definió alineado a los objetivos del proyecto y su objetivo principal de desarrollar nanopartículas lipídicas para vehiculizar siRNA a través de la BHE. Esta definición respondió también a las particularidades identificadas durante las pruebas preliminares. El proceso de establecimiento del perfil de calidad objetivo se fundamentó en la experiencia previa del grupo de investigación y en la literatura disponible y actualizada sobre la aplicación de la QbD en el desarrollo de nanopartículas lipídicas (384,402). El perfil de calidad objetivo, detallado en la Tabla 18, resume los atributos esenciales que deben ser controlados para garantizar la efectividad y seguridad del medicamento a desarrollar.

Tabla 18: Definición del QTP para la formulación de LNPs para la vehiculización de siRNA a través de la BHE (continúa).

Elemento del QTP	Objetivo	Justificación
Tipo de administración	Parenteral, intravenosa	Esta vía permite una administración directa al torrente sanguíneo ofreciendo un primer control sobre la distribución. Esta técnica reduce la invasividad asociada a otros métodos de administración hacia el SNC.
Forma farmacéutica	Solución coloidal de nanopartículas	Esta forma farmacéutica facilita la administración parenteral de soluciones físicamente estables, asegurando consistencia en la dosis administrada.
Tipo de vector	Vector no viral. Nanopartículas lipídicas, NLC	Este tipo de vehículo presenta una menor inmunogenicidad comparado con otro tipo de vectores. Las nanopartículas lipídicas ofrecen un mayor grado de seguridad y biocompatibilidad que otras nanoestructuras. Su composición estructural proporciona una protección robusta al siRNA, lo cual es crucial para su estabilidad y posterior efectividad de silenciamiento.
Sitio de actividad	Sistema nervioso central	Objetivo estratégico del grupo de investigación. Esto se debe al impacto, prevalencia y complejidad de las enfermedades del SNC. Las nanopartículas representan una solución prometedora para superar los desafíos de transporte impuestos por la BHE.
Tipo de direccionamiento (targeting)	Direccionamiento (targeting) activo con péptidos en superficie	El direccionamiento activo ofrece mayor control y reproducibilidad en la acumulación de nanopartículas, y mayor especificidad al poder ser dirigido a células o receptores específicos
Indicación terapéutica	Silenciamiento genético	De acuerdo con los objetivos estratégicos y experiencia previa del grupo. Además, este tipo de terapias permitirían modular la expresión de genes específicos implicados en patologías del SNC. El silenciamiento génico ofrece el potencial de abordar enfermedades intratables o de manejo limitado por terapias convencionales.

Tabla 18 (continuación): Definición del QTPP para la formulación de LNPs para la vehiculización de siRNA a través de la BHE (continúa).

Elemento del QTPP		Objetivo	Justificación
Atributos de calidad	Apariencia	Cumple con la monografía de la Farmacopea Europea sobre partículas visibles (2.9.20) y subvisibles (2.9.19) en formulaciones parenterales	El cumplimiento regulatorio garantiza la calidad y seguridad, minimizando riesgos de irritación o reacciones adversas en la administración parenteral.
	Identificación de componentes	Identificar los componentes incorporados en la fórmula	Permite valorar reproducibilidad del proceso de fabricación, y es también una herramienta para evaluar la disponibilidad superficial de componentes claves para el proceso de funcionalización para el direccionamiento activo.
	Tamaño de partícula	< 100 nm	Es ampliamente aceptado que la actividad <i>in vivo</i> de las nanopartículas es dependiente del tamaño de partícula. Particularmente, un tamaño inferior a 100 nm facilitaría el paso a través de la BHE.
	Índice de polidispersidad	< 0,2	Un rango estrecho de tamaño de partícula es deseable para un efecto <i>in vivo</i> homogéneo. La información bibliográfica señala que valores inferiores a 0,2 mejoran los parámetros de desempeño biológico de las nanopartículas.
	Potencial zeta	> 10 mV < 40 mV	De acuerdo con el soporte bibliográfico, este valor de potencial zeta mejora la interacción con membranas biológicas, permite mantener la estabilidad coloidal y mejora la biocompatibilidad de las formulaciones de nanopartículas.
	Eficiencia de encapsulación	> 90 %	Corresponde al valor de referencia para la encapsulación de ácidos nucleicos en este tipo de fabricados con lípidos ionizables. Además, esta eficiencia permite maximizar resultados con un menor gasto de material (siRNA).
	Contenido de siRNA	Apto para efecto de silenciamiento en tejido diana sin dar lugar a efectos adversos (a determinar)	La cantidad de siRNA debe ser calibrada para garantizar una respuesta biológica eficaz, sin excederse o ser insuficiente. Esto requiere una detallada evaluación de la respuesta en términos de la cantidad (a determinar en etapas posteriores).
	Eficiencia de Transfección <i>in vitro</i>	> 90 % de células objetivo	Un elevado porcentaje de transfección demuestra la capacidad del vehículo para alcanzar y entrar en células diana. Esta característica de alta eficiencia de transfección establece la validez para, posteriormente, evaluar el silenciamiento génico.
	Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	Bloquear o reducir la expresión de un gen específico	El cumplimiento de este atributo es fundamental para alcanzar uno de los objetivos principales del proyecto. Con este atributo se observa el impacto inhibitorio y valida la eficacia del vehículo para proteger y liberar el siRNA, estableciendo una base sólida para avanzar hacia estudios preclínicos en animales.
	Permeabilidad hacia cerebro	Formulación capaz de cruzar la BHE	La capacidad de cruzar la BHE corresponde al objetivo y reto principal de este proyecto de investigación. El cumplimiento de este atributo es crucial no solo para el transporte de siRNA hacia el SNC, sino para establecer una base para vehicular de forma efectiva moléculas terapéuticas para tratar trastornos neurodegenerativos, desórdenes psiquiátricos y tumores cerebrales.

Tabla 18 (continuación): Definición del QTPP para la formulación de LNPs para la vehiculización de siRNA a través de la BHE.

Elemento del QTPP		Objetivo	Justificación
Atributos de calidad	Esterilidad	Cumple con la monografía de la Farmacopea Europea sobre esterilidad (2.6.1)	La esterilidad es requerida para asegurar bioseguridad minimizando el riesgo para el paciente/los sujetos de estudio.
	Ausencia de citotoxicidad	Biocompatible	En vista de que las nanopartículas poseen una citotoxicidad intrínseca, es importante asegurar su biocompatibilidad en las concentraciones administradas. Por lo tanto, se debe garantizar que no se produzcan reacciones tóxicas en los cultivos y organismos de ensayo, a las concentraciones que se requieran para poder observar efecto terapéutico y biodistribución.
Estabilidad		Mínimo un mes	Una estabilidad de al menos un mes asegura su utilidad para las aplicaciones durante las fases preliminares de los estudios preclínicos. En caso de obtenerse resultados prometedores para aplicaciones clínicas, se deberán realizar estudios adicionales para optimizar la formulación y extender la vida útil, realizando una reformulación y un replanteamiento del QTPP (posiblemente, redefiniendo la forma farmacéutica final y agregando estudios de liofilización).
Condiciones de almacenamiento		Entre 2 y 8 °C	Asegurar condiciones de estabilidad con ese rango de temperatura, reduce el estrés fisicoquímico de la formulación. También facilita el manejo logístico en cuanto a mantenimiento de muestras durante los ensayos preclínicos.

Con el establecimiento del QTPP se genera una base sobre la cual se puede conducir el resto del desarrollo bajo los principios de QbD. Dado el carácter innovador y de investigación exhaustiva de este proyecto de tesis, se determinó que todos los atributos de calidad identificados en la Tabla 18 fuesen considerados críticos. Esto implica que todos ellos fueron incluidos en el análisis de riesgo detallado a partir de la siguiente subsección. Este enfoque se adoptó para evitar la subestimación de riesgos potenciales y de los impactos de los atributos sobre el perfil de calidad. A falta de sustento técnico para reducir la cantidad de atributos de calidad críticos en estas etapas previas, se mantiene un espacio del diseño amplio que permita garantizar la integridad y replicabilidad de la formulación bajo condiciones ampliamente controladas.

4.1.1.2 Análisis de riesgo de las nanopartículas lipídicas

La siguiente etapa del proceso de preformulación involucra la realización de un análisis de riesgo detallado del impacto de los parámetros de formulación y proceso en los atributos críticos de calidad (CQA, por sus siglas en inglés) obtenidos del establecimiento del QTPP. Este análisis es crucial para que las pruebas de desarrollo, y el establecimiento de los controles de la formulación, respondan a las condiciones que impactan la calidad del producto de forma más crítica. También es crucial para guiar el proceso de desarrollo y asegurar optimización de recursos, generando una base para priorizar y ejecutar las pruebas específicas que exploren el espacio del diseño, y se identifiquen los controles más críticos. Los detalles de este análisis de riesgo se presentan en la Tabla 19, justificado de la Tabla 20 a la Tabla 28 (parámetros de formulación), y en la Tabla 29, justificado de la Tabla 30 a la Tabla 35 (parámetros de proceso).

Tabla 19: Análisis de riesgo inicial para parámetros de formulación de nanopartículas lipídicas para la vehiculización de siRNA a través de la BHE.

CQA	Parámetros de formulación								
	Composición general de la fase lipídica	Lípido maleimida		Agente de funcionalización			Soluciones tampón para fabricación y purificación		Cantidad de siRNA a incorporar
		Tipo	%	Tipo	Proporción maleimida/péptido	Composición del Medio de incubación	Composición	pH	
Apariencia	Medio	Bajo	Bajo	Medio	Medio	Medio	Alto	Alto	Bajo
Identificación de componentes	Alto	Alto	Medio	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Medio
Tamaño de partícula	Alto	Bajo	Bajo	Medio	Medio	Medio	Alto	Alto	Medio
PDI	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Bajo
Potencial zeta	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Bajo
Eficiencia de encapsulación	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Alto	Alto
Contenido de siRNA	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Alto	Alto
Eficiencia de Transfección <i>in vitro</i>	Alto	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto	Bajo	Alto	Bajo
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	Alto	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto	Medio	Alto	Alto
Permeabilidad hacia cerebro	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Bajo	Medio	Bajo
Citotoxicidad	Alto	Bajo	Bajo	Medio	Medio	Medio	Bajo	Bajo	Bajo
Seguridad en animales	Alto	Bajo	Bajo	Medio	Medio	Medio	Medio	Bajo	Bajo

Tabla 20: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de composición de la fase lipídica.

CQA	Justificación del riesgo asociado a la composición de la fase lipídica
Apariencia	La apariencia de la suspensión de nanopartículas podría verse indirectamente afectada por la composición específica utilizada, la cual influencia el tamaño de las partículas. Dado que el tamaño de partícula es evaluado directamente bajo otro CQA con otro nivel de riesgo más alto, el riesgo asociado a la apariencia es considerado medio.
Identificación de componentes	Se considera un riesgo alto debido a que la naturaleza química de los componentes afecta la capacidad de identificación y la idoneidad de la aplicación de ciertas técnicas analíticas.
Tamaño de partícula	El riesgo se considera alto ya que en la preparación por mezcla microfluídica, el tamaño y distribución de tamaño de las nanopartículas es dependiente del tamaño (peso molecular) de cada uno de los excipientes.
PDI	
Potencial zeta	El potencial zeta es dependiente de los grupos moleculares expuestos en la superficie de las nanopartículas. Por lo tanto, la composición cualitativa y cuantitativa de las nanopartículas tiene un impacto directo en la composición superficial de estas. El riesgo se considera alto.
Eficiencia de encapsulación	La eficiencia de encapsulación es un parámetro que depende de la adecuada interacción entre el lípido ionizable y el siRNA (dependiente también de la proporción nitrógeno/fosfato, dependiente de la cantidad de lípido ionizable) Por esa razón se considera un riesgo alto.
Contenido de siRNA	El contenido de siRNA depende de una adecuada interacción entre el lípido ionizable. Por ese motivo, el riesgo respecto a la composición de la fase lipídica se considera medio, siempre y cuando se realicen siempre los ajustes para asegurar una proporción nitrógeno/fosfatos elevada (sino, el riesgo sería alto).
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	Estos parámetros son indicadores de la eficacia de la formulación, y son el principal resultado de las pruebas de desempeño. La composición óptima de fosfolípidos asegura una fusión adecuada con membranas celulares, mientras que la proporción adecuada de lípido ionizable asegura encapsulación y liberación oportuna del siRNA. Por lo tanto, el riesgo se considera alto.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	
Permeabilidad hacia cerebro	La revisión de la literatura científica señala que la composición lipídica es uno de varios factores que puede influir en la capacidad de las nanopartículas para atravesar la BHE. El riesgo se considera medio.
Citotoxicidad	Los excipientes a probar han demostrado una baja citotoxicidad y elevada bioseguridad, respaldada además por su eficacia clínica. Sin embargo, el efecto puntual con la formulación específica es desconocido y por lo tanto se considera que el riesgo es alto.
Seguridad en animales	

Tabla 21: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de tipo de lípido maleimida.

CQA	Justificación del riesgo asociado al tipo de lípido maleimida
Apariencia	Los lípidos maleimida (o lípidos funcionales) empleados para la funcionalización muestran una compatibilidad que en la práctica no agregan un riesgo adicional que afecte la apariencia final de la suspensión, por lo que el riesgo se considera bajo
Identificación de componentes	Las diferencias entre los diferentes tipos de lípido maleimida pueden afectar la facilidad con que son identificados mediante las técnicas analíticas disponibles, por lo tanto, se considera un riesgo alto.
Tamaño de partícula	Análogo a lo que se justificó para la apariencia, los lípidos empleados para la funcionalización muestran una compatibilidad que en la práctica no agregan un riesgo adicional que afecte el tamaño y la distribución del tamaño de partícula, por lo que el riesgo se considera bajo
PDI	
Potencial zeta	El lípido maleimida se agrega para que sea posible la modificación superficial de la nanopartícula. Por lo tanto, impacta directamente en la distribución superficial de elementos de la nanopartícula y en el potencial zeta. Por este motivo se considera un riesgo alto.
Eficiencia de encapsulación	En términos de composición estos atributos están asociados a la cantidad de lípido ionizable, no así a la del lípido maleimida. La incorporación de este último no se realizará a expensas del lípido ionizable, por lo que se espera que el impacto en estos atributos sea bajo, y de igual manera se considera el riesgo asociado.
Contenido de siRNA	
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	La modificación superficial es uno de los factores que podría afectar la capacidad de las nanopartículas de ingresar en las células objetivo. Por lo tanto, el riesgo se considera medio.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	
Permeabilidad hacia cerebro	El lípido funcional afecta la funcionalización misma, y la hipótesis principal es que el grado de funcionalización afectará directamente a la capacidad de penetrar a través de la BHE. Por lo tanto, el riesgo se considera alto.
Citotoxicidad	Los lípidos funcionales empleados para funcionalización muestran una compatibilidad que en la práctica no agregan un riesgo adicional que afecte la citotoxicidad y bioseguridad, por lo que el riesgo se considera bajo
Seguridad en animales	

Tabla 22: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación del porcentaje del lípido maleimida.

CQA	Justificación del riesgo asociado al porcentaje de lípido maleimida
Apariencia	Los porcentajes habitualmente empleados de lípido funcional no corresponden a la mayoría dentro de la composición de la nanopartícula. Por lo tanto, este parámetro prácticamente no agrega un riesgo adicional que afecte la apariencia final de la suspensión, por lo que el riesgo se considera bajo.
Identificación de componentes	El porcentaje agregado del excipiente, en caso de ser muy bajo, podría afectar la detectabilidad del material. Por lo tanto, el riesgo se considera medio.
Tamaño de partícula	Análogo a lo que se justificó para la apariencia, y a lo indicado en la Tabla 21 (tipo de lípido maleimida) para este mismo atributo, los lípidos empleados para la funcionalización muestran una compatibilidad que en la práctica no agregan un riesgo adicional que afecte el tamaño y la distribución del tamaño de partícula, por lo que el riesgo se considera bajo
PDI	
Potencial zeta	De acuerdo con la función que cumple, el porcentaje de lípido funcional impacta en la distribución y disponibilidad de grupos maleimida en la superficie de la nanopartícula y, eventualmente, de los péptidos de modificación. Por lo tanto, el riesgo del impacto de este parámetro de formulación en este CQA es alto.
Eficiencia de encapsulación	Como se indicó para el tipo de lípido maleimida (Tabla 21) estos atributos están asociados a la cantidad de lípido ionizable, no así a la del lípido maleimida. La incorporación de este último no se realizará a expensas del lípido ionizable, por lo que se espera que el impacto en estos atributos sea bajo, y de igual manera se considera bajo el riesgo asociado.
Contenido de siRNA	
Eficiencia de Transfección <i>in vitro</i>	La cantidad de lípido maleimida (e indirectamente, del péptido de forma eventual) es crítica para la capacidad de las células para interactuar con las células diana. Dado que estos aspectos son críticos para la efectividad terapéutica se considera que es un riesgo alto.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	
Permeabilidad hacia cerebro	La función del lípido maleimida es brindar la posibilidad de realizar modificaciones superficiales con el objetivo de mejorar la permeabilidad hacia el cerebro. Así, el porcentaje de maleimida puede tener un impacto elevado en la permeabilidad a través de la BHE. Por lo tanto, se considera un riesgo alto.
Citotoxicidad	Al igual que se consideró con el parámetro de tipo de lípido maleimida (Tabla 21), se considera que los lípidos funcionales empleados para funcionalización muestran una compatibilidad que en la práctica no agregan un riesgo adicional que afecte la citotoxicidad y bioseguridad, por lo que el riesgo se considera bajo
Seguridad en animales	

Tabla 23: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de tipo de agente de funcionalización.

CQA	Justificación del riesgo asociado al tipo de agente de funcionalización
Apariencia	El tipo de agente es una de las variables que puede afectar las propiedades fisicoquímicas de la suspensión coloidal y, en consecuencia, a la apariencia de la forma farmacéutica. Por lo tanto, el riesgo para este parámetro se considera medio.
Identificación de componentes	Cada material específico, particularmente cada péptido distinto, que se utilice para la funcionalización tendrá unas características estructurales que puede causar diferencias en la facilidad para poder identificar cada estructura con las técnicas analíticas disponibles.
Tamaño de partícula	El tipo de péptido puede influir en el tamaño mismo de la nanopartícula, así como en las interacciones inter-particulares, pudiendo afectar el tamaño a partir del mismo prototipo. Por esto se considera que es un riesgo medio.
PDI	Aunque puede ser indirectamente influenciado por los cambios en el tamaño fruto de la funcionalización, se considera que la uniformidad de tamaños es más dependiente de la uniformidad de la nanopartícula base, por lo tanto en términos del tipo de agente de funcionalización se considera como un riesgo bajo.
Potencial zeta	Los cambios en el tipo de agente de funcionalización producirán cambios en las propiedades de carga superficial de las nanopartículas. Por lo tanto, este riesgo se considera alto.
Eficiencia de encapsulación	Estos son atributos asociados a las interacciones durante la fabricación de la nanopartícula base, antes de la funcionalización. Por lo tanto, el riesgo asociado se considera bajo.
Contenido de siRNA	
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	Los diferentes péptidos (agente de funcionalización) podrían manifestar distintas capacidades para interactuar con las células diana. Dado que estos aspectos son críticos para la efectividad terapéutica se considera que es un riesgo alto.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	
Permeabilidad hacia cerebro	Una de las principales hipótesis de este trabajo es que la utilización de distintos péptidos tendrá efectos diferenciadores en cuanto a la capacidad de las nanopartículas para atravesar la BHE. Por lo tanto, se considera un riesgo alto.
Citotoxicidad	Los diferentes agentes de funcionalización podrían inducir cambios en la biocompatibilidad, principalmente por cambios en la biodistribución y en la interacción misma con las células del organismo. Este efecto sea posiblemente por una afectación en la acumulación de las nanopartículas, más que cambiando su toxicidad intrínseca. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Seguridad en animales	

Tabla 24: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de proporción maleimida/péptido.

CQA	Justificación del riesgo asociado a la proporción maleimida/péptido
Apariencia	La proporción maleimida/péptido afecta la eficiencia de la funcionalización, no así el porcentaje total máximo posible (que está más ligado a la cantidad de lípido maleimida). De manera que puede tener influencia en la densidad total, pero no es el parámetro más crítico y por eso se considera un riesgo medio.
Identificación de componentes	El exceso de péptido no tiene influencia en la cantidad total adherida a la superficie, la cuál es la que es sujeto de identificación. Por lo tanto, el riesgo asociado a la identificación de componentes se considera bajo.
Tamaño de partícula	La cantidad total de péptido en la superficie puede influir en la agregación de las nanopartículas base. De manera análoga a lo expuesto para el atributo de apariencia, la proporción maleimida/péptido puede influir esta cantidad máxima pero no es el parámetro más crítico, comparado por ejemplo con la cantidad de lípido maleimida. De manera que se considera un riesgo medio.
PDI	Análogo a lo indicado para el parámetro de lípido maleimida, el PDI puede ser indirectamente influenciado por los cambios en el tamaño fruto de la funcionalización. Sin embargo, se considera que la uniformidad de tamaños es más dependiente de la uniformidad de la nanopartícula base. Por lo tanto, en términos de la proporción maleimida/péptido se considera como un riesgo bajo.
Potencial zeta	La cantidad total de péptido en la superficie puede influir en las propiedades de carga superficial de la nanopartícula y se considera un riesgo alto.
Eficiencia de encapsulación	Estos son atributos asociados a las interacciones durante la fabricación de la nanopartícula base, antes de la funcionalización. Por lo tanto, el riesgo asociado se considera bajo.
Contenido de siRNA	
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	La proporción maleimida péptido es crítica para poder determinar la densidad efectiva de funcionalización en la superficie de las nanopartículas, la cuál es un factor esencial para la interacción adecuada con las células diana. Hay una incertidumbre en cuanto a la cantidad óptima de funcionalización necesaria para un efecto terapéutico, que eleva el nivel de riesgo evaluado. Por esto se considera un riesgo alto.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	
Permeabilidad hacia cerebro	De forma análoga a lo expuesto para eficiencia de transfección y capacidad de silenciamiento, la incertidumbre que hay sobre qué niveles de densidad de funcionalización son los óptimos, y el posible efecto de la proporción maleimida/péptido en esos niveles de expresión, se considera que el riesgo es alto.
Citotoxicidad	La expresión de diferentes niveles de agente de funcionalización podría inducir cambios en la biocompatibilidad, principalmente por cambios en la biodistribución y en la interacción misma con las células del organismo. Este efecto sea posiblemente por una afectación en la acumulación de las nanopartículas, más que cambiando su toxicidad intrínseca. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Seguridad en animales	

Tabla 25: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de composición del medio de incubación.

CQA	Justificación del riesgo asociado a la composición del medio de incubación
Apariencia	Debido a su impacto en la eficiencia de la funcionalización, el parámetro de composición del medio de incubación puede afectar el tamaño de partículas y de esa forma indirectamente la apariencia final y por lo tanto se considera un riesgo medio.
Identificación de componentes	El medio de incubación no forma parte de la nanopartícula final y no está sujeto a identificación. Por lo tanto, el riesgo es bajo.
Tamaño de partícula	De manera análoga a lo justificado para el atributo de apariencia, la composición del medio de incubación puede influir en la eficiencia de la funcionalización, y de esa forma afectar en el tamaño de partícula junto con otros parámetros involucrados. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
PDI	Aunque podría influenciar indirectamente por la eficiencia de la funcionalización, se considera que la uniformidad de tamaños es más dependiente de la uniformidad de la nanopartícula base. Por lo tanto, en términos de la composición del medio de incubación, se considera como un riesgo bajo.
Potencial zeta	Al afectar la eficiencia de la funcionalización, la composición del medio de incubación puede afectar las propiedades superficiales de la nanopartícula y por lo tanto impactar en el potencial zeta. Por esto se considera que el riesgo es alto.
Eficiencia de encapsulación	Estos son atributos asociados a las interacciones durante la fabricación de la nanopartícula base, antes de la funcionalización. Por lo tanto, el riesgo asociado se considera bajo.
Contenido de siRNA	
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	La densidad efectiva de funcionalización en la superficie de las nanopartículas es un factor esencial para la interacción adecuada con las células diana. El medio de incubación afectará la cantidad final de péptido. Hay una incertidumbre en cuanto a la cantidad óptima de funcionalización necesaria para una efecto terapéutico, que eleva el nivel de riesgo evaluado. Por esto se considera un riesgo alto.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	
Permeabilidad hacia cerebro	De forma análoga a lo expuesto para eficiencia de transfección y capacidad de silenciamiento, la incertidumbre que hay sobre cuáles niveles de densidad de funcionalización son los óptimos, y el posible efecto de la composición del medio de incubación, justifica la asignación de un riesgo alto.
Citotoxicidad	La composición del medio de incubación puede afectar al grado de funcionalización de las nanopartículas. Como se ha expuesto anteriormente, la expresión de diferentes niveles de agente de funcionalización podría inducir cambios en la biocompatibilidad, principalmente por cambios en la biodistribución y en la interacción misma con las células del organismo. Posiblemente afectando la acumulación de la nanopartículas, más que cambiando su toxicidad intrínseca. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Seguridad en animales	

Tabla 26: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de composición de las soluciones tampón para fabricación y purificación.

CQA	Justificación del riesgo asociado a la composición de las soluciones tampón para fabricación y purificación
Apariencia	La composición de las soluciones tampón utilizadas para la fabricación (fase acuosa) y la purificación de las nanopartículas corresponde al tipo de sal y concentración utilizada. Estas pueden influir en la estabilidad coloidal de la suspensión afectando así la apariencia. Por esto se considera un riesgo alto.
Identificación de componentes	Las fases acuosas no forman parte de la nanopartícula final, por lo tanto, no están sujetas a identificación. Además, su influencia sobre la identificación de los componentes sería mínima, ya que el método analítico incluirá la adición de su propia solución tampón. Por lo tanto, el riesgo es bajo.
Tamaño de partícula	Debido a variaciones en la carga iónica de la suspensión, la composición de las soluciones tampón pueden afectar la aglomeración y por lo tanto al tamaño y uniformidad del tamaño de las nanopartículas. Esta influencia puede darse tanto en su fase de fabricación como en la purificación. Por lo tanto, se considera un riesgo alto.
PDI	
Potencial zeta	Los iones presentes en las soluciones tampón afectan la forma en que las nanopartículas crean la capa iónica a su alrededor, y por lo tanto impactando en el potencial zeta. Por este motivo se considera un riesgo alto.
Eficiencia de encapsulación	La existencia de una solución tampón es esencial para que se pueda dar la encapsulación de siRNA durante la fase de formación de las nanopartículas. Sin embargo, según literatura, el pH es un factor más crítico independientemente de la composición cualitativa de la solución. Por este motivo la composición de las soluciones tampón de fabricación se considera un riesgo medio.
Contenido de siRNA	Por su influencia en la eficiencia de encapsulación, esta composición de las soluciones tampón también puede afectar al contenido de siRNA. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	La eficiencia de transfección está ligada a la composición de la nanopartícula misma, que está ligada a la composición de la fase lipídica más que a la de la fase acuosa. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	La influencia sobre la capacidad de silenciamiento está asociada a la influencia que tiene sobre la eficiencia de encapsulación y contenido de siRNA. Por lo tanto, y como ya se justificó para cada uno de esos atributos, el riesgo para la composición de las soluciones tampón se considera medio.
Permeabilidad hacia cerebro	La permeabilidad hacia el cerebro depende de la composición lipídica de la nanopartícula base y de las características de funcionalización. Por lo tanto, el riesgo asociado a las soluciones tampón de fabricación y purificación se considera bajo.
Citotoxicidad	Aunque la composición del tampón puede tener un efecto en la citotoxicidad, se usarán compuestos compatibles contrastados por su frecuente uso como excipientes tampón en el desarrollo de medicamentos para administración parenteral. Por otra parte, la citotoxicidad está más asociada a la composición de la nanopartícula en sí misma, y por lo tanto se considera un riesgo bajo.
Seguridad en animales	La seguridad en animales representa un riesgo intermedio, puesto que la osmolaridad de la solución final depende de las soluciones tampón utilizadas para la purificación final, y esta se realizará con medio compatible (PBS 1X). Por lo tanto, se considera un riesgo intermedio.

Tabla 27: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación del pH de las soluciones tampón utilizadas para la fabricación y purificación.

CQA	Justificación del riesgo asociado al pH de las soluciones tampón utilizadas para la fabricación y purificación
Apariencia	El pH de la solución acuosa utilizada en la fabricación influirá en la interacción entre las partículas lipídicas, al cambiar el grado de ionización del lípido ionizable. De igual manera, la carga de la nanopartícula y su tendencia a repelerse o aglomerarse se verán afectadas en gran medida por el pH del medio. Por lo tanto, se considera un riesgo alto.
Identificación de componentes	Su influencia sobre la identificación de los componentes sería mínima, ya que el método analítico incluirá la adición de su propia solución tampón. Por lo tanto, el riesgo es bajo.
Tamaño de partícula	La justificación aportada en el atributo de apariencia es consecuencia de los efectos directos del pH en el tamaño de partícula. Efectivamente, el pH de las soluciones de fabricación y purificación afectarán directamente el tamaño de partícula y la polidispersidad de las mismas, por lo que se considera un riesgo alto.
PDI	
Potencial zeta	En concordancia con lo justificado en la Tabla 26, se tiene establecido que el pH del medio afectará de manera importante las características de carga superficial. Por lo tanto, representa un riesgo alto para el atributo del potencial zeta.
Eficiencia de encapsulación	Para una apropiada encapsulación del siRNA, se requiere un control del pH durante la fabricación para asegurar que el lípido ionizable está en su forma catiónica, y así pueda interactuar con el siRNA. Por lo tanto, el parámetro de pH en la solución de fabricación es crítico para la eficiencia de encapsulación.
Contenido de siRNA	La adecuada ionización del lípido ionizable es crítica para la formación y también la estabilidad de los complejos lípido siRNA. Por lo tanto, el pH de las fases acuosas es crítico y representa un riesgo alto para el contenido de siRNA.
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	El pH puede alterar la carga y estructura superficial de las nanopartículas y por lo tanto puede modificar la capacidad de las mismas para atravesar membranas celulares. Por esto se considera que el riesgo es alto.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	Además de afectar la capacidad de ingresar en las células, el pH durante las diferentes fases de la preparación de nanopartículas tendrá influencia en la estabilidad del complejo siRNA y en la capacidad de encapsulación. Por lo tanto, se categoriza como un riesgo alto.
Permeabilidad hacia cerebro	En caso de modificar el potencial zeta, este parámetro podría alterar también la interacción con las membranas y por lo tanto la permeabilidad hacia el cerebro. Por este motivo se considera un riesgo medio.
Citotoxicidad	Con la diálisis final, se susituirá el medio siempre por un pH fisiológico. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.
Seguridad en animales	Con la diálisis final, se susituirá el medio siempre por un pH fisiológico. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.

Tabla 28: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro de formulación de cantidad de siRNA a incorporar.

CQA	Justificación del riesgo asociado a la cantidad de siRNA a incorporar
Apariencia	Las características relacionadas con el atributo de apariencia son más afectadas por otros componentes de la nanopartícula, como la matriz lipídica y elementos superficiales. Así, se considera que la cantidad de siRNA a encapsular no afecta a la apariencia del medicamento final. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.
Identificación de componentes	La cantidad incorporada puede afectar la detectabilidad del siRNA, dependiendo de la sensibilidad de la prueba. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Tamaño de partícula	La encapsulación de material dentro de la nanopartícula puede generar cambios en el tamaño de la nanopartícula relacionados con la cantidad. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
PDI	La cantidad de siRNA encapsulada no altera las interacciones superficiales de las nanopartículas por lo que no se espera cambios en el nivel de agregación, y por lo tanto afectación el PDI.
Potencial zeta	El potencial zeta se ve influenciado por la composición superficial de la nanopartícula más que por el contenido interno. Por lo tanto, el riesgo asociado a este atributo es bajo.
Eficiencia de encapsulación	La cantidad de siRNA, y en particular, la cantidad relativa a la cantidad de lípido ionizable, controlada a través del parámetro de la proporción nitrógeno/fosfato (N/P) condiciona la obtención de una encapsulación eficiente. Por lo tanto, se considera un riesgo alto.
Contenido de siRNA	El contenido de siRNA es dependiente directo de la cantidad de siRNA que se incorpore. Representa por lo tanto un riesgo alto.
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	La eficiencia de transfección es un atributo que depende principalmente de la composición de la matriz lipídica y sus características superficiales, más que de su contenido. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	El adecuado efecto terapéutico de silenciamiento es dependiente de que la cantidad apropiada de siRNA se apropiadamente vehiculizada. Por lo tanto, el parámetro de cantidad de siRNA representa un riesgo alto en relación a este atributo de calidad.
Permeabilidad hacia cerebro	La cantidad de siRNA no representa un parámetro crítico para este atributo, ya que está más relacionado con las propiedades superficiales de las nanopartículas que con el contenido interno encapsulado.
Citotoxicidad	La citotoxicidad está relacionada con la composición global de la nanopartícula y no con la cantidad de siRNA (al menos que silencie un proceso crítico para la célula, que entonces sería un problema del target terapéutico elegido). Por lo tanto, considerando solo los parámetros de formulación galénicos, se considera un riesgo bajo.
Seguridad en animales	Cuando se estén silenciando genes que expresan o dan lugar a condiciones patológicas y no a procesos vitales, la seguridad en animales no está asociada a la cantidad de siRNA, sino a la composición general de las nanopartículas o al objetivo terapéutico elegido. Por lo tanto, considerando solo los parámetros de formulación galénicos, se considera un riesgo bajo.

Tabla 29: Análisis de riesgo inicial para parámetros críticos de proceso (CPP) de nanopartículas lipídicas para la vehiculización de siRNA a través de la BHE.

CQA	Parámetros de proceso					
	Mezcla microfluidica			Diálisis / purificación		Tiempo de incubación (para funcionalización)
	Flujo total (TF)	Proporción de flujo (FRR)	Tipo y diseño del chip de mezcla	Ejecución de diálisis	Duración del protocolo de purificación	
Apariencia	Alto	Alto	Medio	Alto	Medio	Medio
Identificación de componentes	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Medio
Tamaño de partícula	Alto	Alto	Alto	Medio	Medio	Medio
PDI	Alto	Alto	Alto	Medio	Medio	Medio
Potencial zeta	Medio	Medio	Medio	Alto	Medio	Alto
Eficiencia de encapsulación	Medio	Medio	Medio	Bajo	Medio	Medio
Contenido de siRNA	Medio	Medio	Medio	Bajo	Medio	Medio
Eficiencia de Transfección <i>in vitro</i>	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Medio	Medio
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Medio
Permeabilidad hacia cerebro	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Alto
Citotoxicidad	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio
Seguridad en animales	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio

Tabla 30: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de flujo total (TF)

CQA	Justificación del riesgo asociado al TF
Apariencia	El TF es reportado en la literatura como uno de los parámetros más importantes para el tamaño de las partículas. La apariencia de la forma farmacéutica es resultado de la estabilidad coloidal y tamaño de esas partículas, y por lo tanto se considera un riesgo alto.
Identificación de componentes	El TF, aunque puede incidir en el rendimiento de la mezcla y por lo tanto en la proporción final de los componentes, no incide directamente en la presencia o no de diferentes componentes en la nanopartícula final. Es decir, podría influir cuantitativamente pero no cualitativamente. Por esto se considera un riesgo bajo para este atributo de calidad.
Tamaño de partícula	La literatura disponible establece un claro impacto del TF en estos dos atributos de calidad. Este impacto podría estar causado principalmente por el efecto de la velocidad de mezcla y la velocidad de nucleación de las nanopartículas. De hecho, el TF es uno de los dos parámetros críticos de proceso más importantes, y el tamaño de partícula y PDI los dos atributos de calidad más comúnmente reportados. Por lo tanto, se considera como un riesgo particularmente alto.
PDI	
Potencial zeta	El TF afectará la eficacia del proceso de mezcla dentro del chip microfluídico. Cambios en el flujo podrán impactar en el empaquetamiento e interacción de los componentes, y por lo tanto podría, eventualmente, impactar en el potencial zeta. Se considera un riesgo medio.
Eficiencia de encapsulación	Debido a cambios en la eficacia del proceso de mezcla, el TF puede impactar las interacciones del lípido ionizable durante la mezcla y, por lo tanto, afectar su capacidad para generar complejos lípido-siRNA. Por esto se considera un riesgo medio.
Contenido de siRNA	
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	Aunque se señaló un riesgo medio en la afectación de las características superficiales, este es solo uno de diversos factores que pueden afectar la transfección. La eficiencia de transfección está más relacionada con la composición misma de la nanopartícula. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	El TF puede indirectamente afectar la capacidad de silenciamiento, por sus efectos en el contenido de siRNA (riesgo medio). Sin embargo, la capacidad de silenciamiento en sí depende más de la estabilidad del complejo y la capacidad de liberación, que son más dependientes de la composición de la nanopartícula. Por esto se considera un riesgo bajo.
Permeabilidad hacia cerebro	De manera indirecta, por su efecto en el tamaño de partícula y polidispersidad, el TF puede tener un efecto respecto a la permeabilidad hacia cerebro. Por esto se considera un riesgo medio.
Citotoxicidad	La citotoxicidad está relacionada con la composición de la nanopartícula misma más que con condiciones de proceso. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.
Seguridad en animales	La seguridad de la preparación se relaciona con composición de las nanopartículas y características de la suspensión y posiblemente no exista influencia del flujo. El riesgo se considera bajo.

Tabla 31: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de la proporción de flujo (FRR)

CQA	Justificación del riesgo asociado a la proporción de flujo
Apariencia	La proporción de flujo (FRR por sus siglas en inglés) es reportada en la literatura como uno de los parámetros más importantes para el tamaño de las partículas. La apariencia de la forma farmacéutica es resultado de la estabilidad coloidal y tamaño de esas partículas y por lo tanto se considera un riesgo alto.
Identificación de componentes	Aunque el FRR podría influir en las cantidades finales de los componentes lipídicos no incide en su presencia o proporción de manera que pueda afectar su identificación. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.
Tamaño de partícula	La literatura disponible establece un claro impacto entre estos atributos de calidad y el parámetro de FRR. Este puede afectar la velocidad y de formación de las nanopartículas y, por lo tanto, a su tamaño y PDI. De hecho, el TF es uno de los dos parámetros críticos de proceso más importantes, y el tamaño de partícula y PDI los dos atributos de calidad más comúnmente reportados. Por lo tanto, se considera como un riesgo particularmente alto.
PDI	
Potencial zeta	Debido al proceso de mezcla, el parámetro de FRR puede afectar al potencial zeta y por ello a la composición superficial de la nanopartícula, aunque la composición tendrá un efecto predominante sobre este atributo. Por esto se considera que el riesgo es medio.
Eficiencia de encapsulación	En vista de que puede afectar la eficacia del proceso de mezcla, el parámetro de FRR puede impactar las interacciones del lípido ionizable durante la mezcla y, por lo tanto, afectar su capacidad para generar complejos lípido-siRNA. Por esto se considera un riesgo medio.
Contenido de siRNA	
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	Aunque se señaló un riesgo medio en la afectación de las características superficiales, este es solo uno de diversos factores que pueden afectar la transfección. La eficiencia de transfección está más relacionada con la composición misma de la nanopartícula. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	El parámetro de FRR puede indirectamente afectar la capacidad de silenciamiento, por sus efectos en el contenido de siRNA (riesgo medio). Sin embargo, la capacidad de silenciamiento en sí depende más de la estabilidad del complejo y la capacidad de liberación, que son más dependientes de la composición de la nanopartícula. Por esto se considera un riesgo bajo.
Permeabilidad hacia cerebro	Al igual que en el caso del TF, podría afectar de manera indirecta, por su efecto en el tamaño de partícula y polidispersidad, la permeabilidad hacia cerebro. Por esto se considera un riesgo medio.
Citotoxicidad	La citotoxicidad está relacionada con la composición de la nanopartícula misma más que con condiciones de proceso. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.
Seguridad en animales	La seguridad de la preparación se relaciona con composición de las nanopartículas y características de la suspensión y posiblemente no exista influencia del parámetro de FRR. El riesgo se considera bajo.

Tabla 32: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de tipo y diseño del chip de mezcla

CQA	Justificación del riesgo asociado al diseño del chip
Apariencia	El tipo de chip impacta en la eficiencia y velocidad de la mezcla. Aunque podría tener un efecto sobre el tamaño de partícula y de manera indirecta sobre la apariencia fina, se considera un riesgo medio.
Identificación de componentes	El tipo de chip no influye en la presencia o proporción de los componentes lipídicos, por lo que se considera un riesgo bajo.
Tamaño de partícula	Al impactar en la velocidad y eficiencia del proceso de mezcla, puede afectar la formación de las nanopartículas, su tamaño y PDI. Por lo tanto, se considera un riesgo alto para estos atributos de calidad.
PDI	
Potencial zeta	La eficiencia y velocidad del proceso de mezcla podría afectar el empaquetamiento de los lípidos y la composición superficial de la nanopartícula, podría alterar de forma moderada el potencial zeta. Se considera que el riesgo del tipo de chip es medio.
Eficiencia de encapsulación	El diseño del chip puede tener impacto en estos atributos debido a su efecto en la dinámica de la mezcla. Al igual que se ha justificado para los otros parámetros que influyen en la mezcla (TF y FRR), podría impactar las interacciones del lípido ionizable durante la mezcla afectando su capacidad para generar complejos lípido-siRNA. Por lo tanto, también se considera un riesgo medio.
Contenido de siRNA	
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	Aunque las condiciones de mezcla podrían afectar la distribución de materiales dentro de la nanopartícula, afectando así sus características de fusogenicidad y características superficiales, la eficiencia de transfección está más relacionada con la composición. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	El parámetro de diseño del chip puede indirectamente afectar la capacidad de silenciamiento, por sus efectos en el contenido de siRNA (riesgo medio). Sin embargo, la capacidad de silenciamiento en sí depende más de la estabilidad del complejo y la capacidad de liberación, que son más dependientes de la composición de la nanopartícula. Por esto se considera un riesgo bajo.
Permeabilidad hacia cerebro	Al igual que en el caso del TF y FRR, el diseño del chip podría afectar de manera indirecta la permeabilidad hacia cerebro, por su efecto en el tamaño de partícula y polidispersidad. Por esto se considera un riesgo medio.
Citotoxicidad	La citotoxicidad está relacionada con la composición de la nanopartícula misma más que con condiciones de proceso. Por lo tanto, se considera un riesgo bajo.
Seguridad en animales	La seguridad de la preparación se relaciona con composición de las nanopartículas y características de la suspensión y posiblemente no exista influencia del parámetro de diseño del chip. El riesgo se considera bajo.

Tabla 33: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de ejecución de la diálisis.

CQA	Justificación del riesgo asociado a la ejecución de diálisis
Apariencia	Debido a la sustitución del medio dispersante, la purificación de las nanopartículas mediante diálisis generará un cambio en la composición iónica de la suspensión, pudiendo afectar, por lo tanto, a la tendencia de las nanopartículas a aglomerarse o repelerse. Así, este proceso podría afectar la apariencia final. Por esto se considera un riesgo alto.
Identificación de componentes	La identificación se realiza sobre la fase dispersa de la forma final, que corresponde a las nanopartículas mismas. Por lo tanto, el riesgo de la ejecución o no de este proceso en este atributo es bajo.
Tamaño de partícula	La ejecución de la diálisis podría generar cambios en el tamaño observado debido a que podría facilitar, o reducir, la capacidad de las nanopartículas a aglomerarse. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
PDI	
Potencial zeta	En concordancia con lo justificado en esta tabla para los atributos anteriores, y en la Tabla 26y la Tabla 27, el cambio en las condiciones iónicas del medio afectará de manera importante las interacciones electrostáticas de las nanopartículas. Por lo tanto, este parámetro representa un riesgo alto para el potencial zeta.
Eficiencia de encapsulación	Estos atributos se ven definidos durante el proceso de fabricación de la nanopartícula base. Por lo tanto, el riesgo de que el proceso de purificación impacte en ellos es bajo, a menos que se prolongue en el tiempo.
Contenido de siRNA	
Eficiencia de Transfección <i>in vitro</i>	Por su efecto en el potencial zeta de las nanopartículas y su biocompatibilidad (justificado más adelante en esta tabla), la ejecución de la diálisis podría afectar de manera indirecta la eficiencia de transfección. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	Por sus efectos en la eficiencia de transfección y sus posibles efectos en la estabilidad estructural de la nanopartícula, se considera que la ejecución de la diálisis tiene un efecto medio en la capacidad de silenciamiento.
Permeabilidad hacia cerebro	La purificación de las nanopartículas podría impactar la permeabilidad hacia el cerebro de forma indirecta por su impacto en el tamaño y las características superficiales de la nanopartícula. Por lo tanto, la ejecución de la purificación se considera un riesgo medio.
Citotoxicidad	La ejecución de la purificación puede tener un importante impacto en la citotoxicidad de la preparación, pues tiene entre sus objetivos eliminar el resto de etanol de la etapa de fabricación y asegurar así un medio biocompatible. Por lo tanto, se considera un riesgo alto.
Seguridad en animales	Bajo el mismo argumento justificado para la citotoxicidad, la ejecución de la diálisis es crítica para la biocompatibilidad y la administración en animales de experimentación. Por lo tanto, se considera un riesgo alto.

Tabla 34: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de duración del protocolo de la diálisis.

CQA	Justificación del riesgo asociado a la duración de la diálisis
Apariencia	La duración de la diálisis puede permitir una mayor o menor estabilización de las nanopartículas, lo que podría afectar la apariencia final de la formulación, sobre todo si aparecen aglomerados. Por lo tanto, se considera que el riesgo es medio.
Identificación de componentes	La identificación se realiza sobre la fase dispersa de la forma final, que corresponde a las nanopartículas mismas. Por lo tanto, riesgo es bajo.
Tamaño de partícula	La duración del proceso de purificación podría afectar el tamaño de las partículas en caso de que exista inestabilidad física, y una aglomeración no controlada. De igual manera, esto provocaría una reducción en la homogeneidad del tamaño. Se considera que el riesgo es medio.
PDI	
Potencial zeta	La duración de la diálisis podría influir en la estabilidad de las interacciones iónicas entre la nanopartícula y el medio, pero no cambiar significativamente esa distribución superficial. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Eficiencia de encapsulación	La duración de la diálisis podría afectar la eficiencia de encapsulación si, por una duración prolongada no optimizada, provoca pérdida del material encapsulado.
Contenido de siRNA	Una duración de la diálisis prolongada, no optimizada, podría provocar fugas del material interno reduciendo así el contenido de siRNA. Por este motivo se considera un riesgo medio.
Eficiencia de transfección <i>in vitro</i>	Por los posibles cambios en las características superficiales de las nanopartículas, se considera un riesgo medio para la eficiencia de transfección.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	Los posibles efectos sobre la capacidad de silenciamiento de la duración del proceso de diálisis están asociadas al riesgo de reducción en el contenido de siRNA. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Permeabilidad hacia cerebro	La duración de la diálisis puede tener efectos en las características fisicoquímicas de las nanopartículas, y por lo tanto afectar su capacidad para atravesar la BHE. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Citotoxicidad	La diálisis tiene como objetivo principal mejorar la biocompatibilidad de la suspensión de nanopartículas. El que se alcance un equilibrio es requerido para garantizar esa compatibilidad con medios de cultivo celular y la seguridad de administración. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Seguridad en animales	

Tabla 35: Justificación del análisis de riesgo inicial para el parámetro crítico de proceso de tiempo de incubación durante la funcionalización.

CQA	Justificación del riesgo asociado al tiempo de incubación
Apariencia	Al igual que el proceso de purificación, una exposición prolongada en el proceso de funcionalización puede afectar la apariencia por posible aglomeración de las partículas. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Identificación de componentes	El grado en que los elementos de funcionalización sean incorporados se verá influenciado por el tiempo de incubación. De manera que dependiendo de ese tiempo, la identificación podría verse afectada, si no se alcanzan niveles de contenido suficientes para la sensibilidad de las pruebas a aplicar. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Tamaño de partícula	La cantidad total de péptido en la superficie puede influir en la agregación de las nanopartículas base. El tiempo de incubación influye en la eficiencia de funcionalización. También el tiempo de exposición puede afectar la estabilidad por procesos de aglomeración, afectando no solo el tamaño sino al PDI. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
PDI	
Potencial zeta	La cantidad de péptido que se logre acoplar en la incubación incidirá directamente en la carga superficial de las nanopartículas y de esa manera en el potencial zeta. Por lo tanto, se considera un riesgo alto.
Eficiencia de encapsulación	Al igual que se señaló con la duración del proceso de diálisis, una exposición prolongada y no optimizada podría provocar pérdida del material encapsulado, afectando así el contenido y la eficiencia. Por este motivo se considera un riesgo medio.
Contenido de siRNA	
Eficiencia de Transfección <i>in vitro</i>	La eficiencia de transfección podría verse afectada por el tiempo de incubación si la cantidad de agente de funcionalización afecta la interacción con las células diana. En este caso se considera un riesgo medio.
Capacidad de silenciamiento <i>in vitro</i>	Se considera un riesgo medio debido a la combinación entre el impacto descrito previamente en el contenido de siRNA y la eficiencia de transfección. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Permeabilidad hacia cerebro	Debido a que el proceso de funcionalización tiene como objetivo justamente impactar en el atributo de permeabilidad hacia el cerebro, este parámetro de incubación se espera que tenga un impacto que corresponde a un riesgo alto.
Citotoxicidad	La expresión de diferentes niveles de agente de funcionalización podría inducir cambios en la biocompatibilidad, principalmente por cambios en la biodistribución y en la interacción misma con las células del organismo. Esta afectación podría ser fruto de cambios en la acumulación de las nanopartículas, más que cambios su toxicidad intrínseca. Por lo tanto, se considera un riesgo medio.
Seguridad en animales	

Guiado por los principios de QbD, el proceso de preformulación permitió establecer una base sólida desde la que se estructuran estudios de causa y efecto para la fase de formulación. El estudio de preformulación incluyó también una recopilación de los datos fisicoquímicos relevantes para los principales materiales a utilizar. Estos se encuentran en el Anexo 1, Tabla A 1. Esta etapa de establecimiento del QTPP y el análisis de riesgos permitió priorizar qué aspectos deben ser estudiados exhaustivamente, y cuáles pueden ser definidos o simplemente observados sin un control estricto. Este enfoque permite que el trabajo de diseño experimental de las siguientes secciones pueda ser delimitado de forma objetiva.

Los estudios de formulación detallados a continuación pretenden aumentar el nivel de certeza sobre los efectos de los parámetros con efectos más críticos, ya sea evaluando de forma exhaustiva su perfil de respuesta, o estableciéndoles como niveles fijos limitando la variabilidad asociada y optimizando el desarrollo experimental. La selección y priorización de los parámetros a evaluar se basó en la criticidad identificada en el análisis de riesgo de la sección 4.1.1.2.

El resto de esta sección 4.1 se enfoca en el desarrollo de las nanopartículas base y su impacto en los CQA de naturaleza fisicoquímica. Para la presentación de los resultados se consideró conveniente una estructura que presenta cada CQA de forma independiente, evaluando dentro de cada subsección los CPP que fueron priorizados en función de su riesgo para ese CQA. Acorde con la estructuración expuesta en la metodología, las evaluaciones relacionadas con la funcionalización y la evaluación del desempeño biológico se abordan en las secciones 4.2 y 4.3, respectivamente. En estas secciones se mantiene la estructuración de los resultados agrupándolos por CQA según la priorización que refleja el análisis de la sección 4.1.1.2.

4.1.2 Estudios de formulación para optimizar la distribución de tamaño de partícula y PDI

Las primeras exploraciones en el diseño de la formulación se orientaron en abordar de forma sistemática los efectos sobre dos atributos claves para cumplir el perfil de calidad de producto: el tamaño de partícula y el PDI. Esta sección presenta los resultados de la exploración de los efectos de las variables de composición de la fase lipídica, de las soluciones tampón utilizadas en la manufactura, el flujo total, y el FRR. Estos parámetros fueron señalados como interacciones críticas en la Tabla 19 y en la Tabla 29.

4.1.2.1 Efecto de la composición de la fase lipídica.

El efecto de la composición de la fase lipídica sobre el tamaño de partícula y el PDI se analiza en dos bloques distintos. En el primero se evalúa el efecto de cambiar la concentración de lípidos totales de la fase etanólica (2,5 mM y 25 mM), y el tipo lípido ionizable (o catiónico) utilizado: Dlin-MC3-DMA y DOTAP. Para este bloque inicial, el resto de los componentes de la fase etanólica y su proporción porcentual se mantienen constantes, utilizando como base la fórmula indicada en la Tabla 11 (sección 3.2.1.2). Las condiciones de manufactura para todos los lotes en este bloque se encuentran en un flujo total de 3000 ± 300 mL/min, mientras que el FRR se encontraba entre 3 y 9, sin realizar ninguna purificación de las nanopartículas. Los resultados principales de este bloque se presentan de la Figura 29 a la Figura 31.

El segundo bloque corresponde a un diseño de experimentos (DoE) de mezcla, de vértices extremos, cuyos detalles se especifican en la Tabla 14 (sección 3.3.1.1.1). Para este diseño se tomó como constante la concentración total de lípidos de 2,5 mM, un flujo total de 3000 mL/min y un FRR de 3. De igual forma los datos considerados no incluyen la realización de ninguna purificación. Los resultados principales se presentan de la en la Figura 32 y la Figura 33.

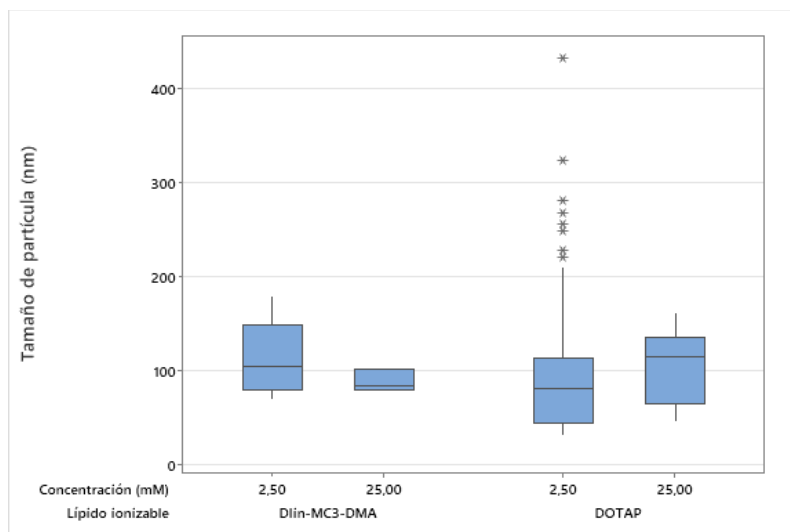


Figura 29: Comparación del tamaño de partícula obtenidas con diferentes concentraciones de lípidos totales y diferentes lípidos ionizables

La gráfica de cajas muestra una mayor dispersión de datos para las muestras fabricadas con DOTAP, particularmente con las de una concentración de lípidos totales de 2,5 mM, las cuáles muestran varios datos atípicos. Un análisis de varianza demostró diferencias significativas para la concentración total de lípidos totales y para el tipo de lípido ionizable (valor $p < 0,05$) (N=189).

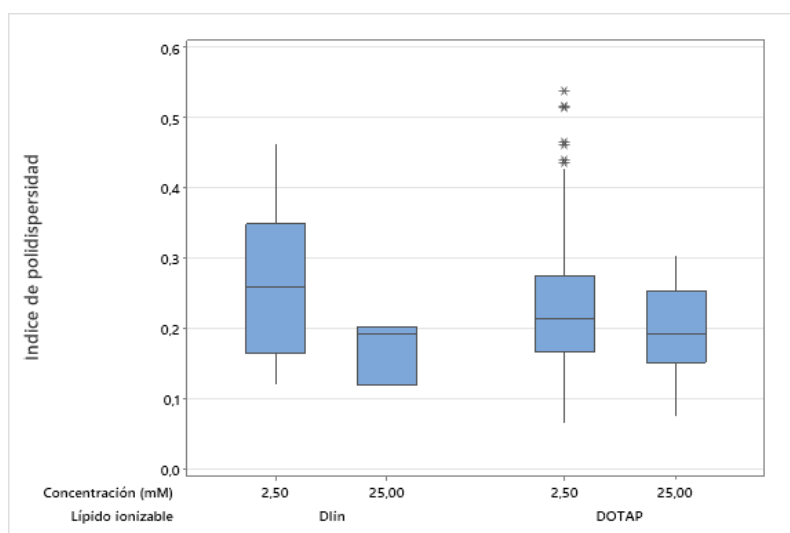


Figura 30: Comparación del PDI obtenido con diferentes concentraciones de lípidos totales y diferentes lípidos ionizables

La gráfica de cajas muestra una mayor dispersión de datos para las muestras fabricadas con al 2,5 mM de lípidos totales, especialmente por la fabricadas con DOTAP. Un análisis de varianza demostró diferencias significativas para la concentración de lípidos totales (valor $p < 0,001$) pero no para el tipo de lípido ionizable (valor $p > 0,05$) (n total=189) (N=189).

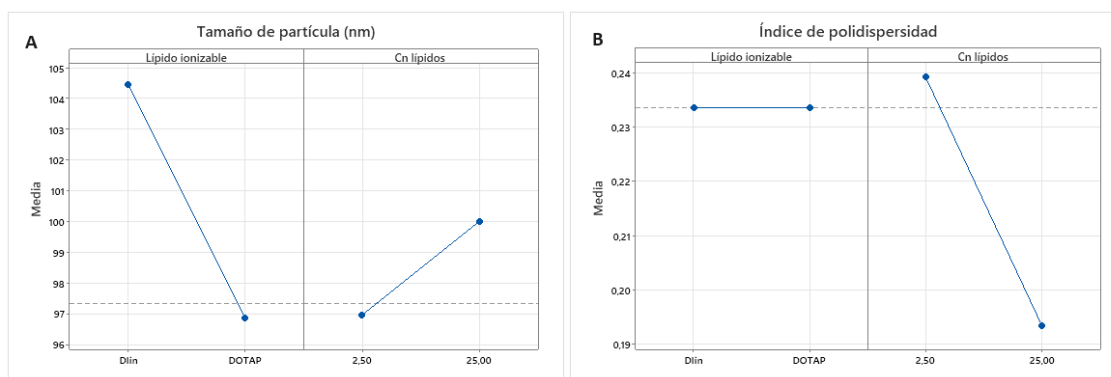


Figura 31: Efectos principales de la concentración de lípidos totales y el tipo de lípido ionizable en el tamaño de partícula y el PDI

La diferencia en el tamaño de partícula a causa del tipo de lípido (15-A, a la izquierda) y en el PDI a causa de la concentración (15-B, a la derecha) demostraron tener significancia estadística (valor $p < 0,05$, $N=189$)

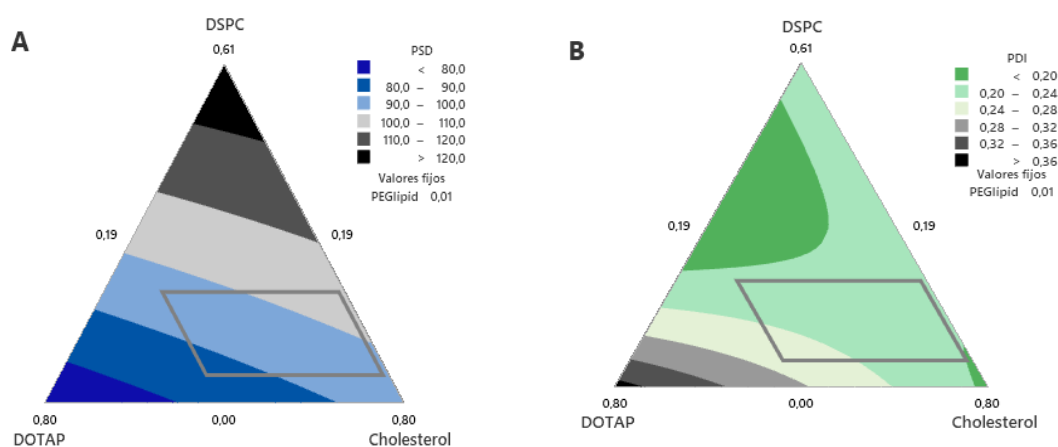


Figura 32: Efecto del cambio de proporción de los lípidos en el tamaño de partícula y el PDI

La gráfica de contorno de respuesta observada en el DoE para los cambios en la mezcla de componentes de referencia: DSPC, Colesterol y DOTAP dentro de los rangos de proporciones descritos entre la base y el vértice del triángulo. La gráfica considera un valor fijo del lípido pegilado de 0,01. A) El aumento de DSPC correlaciona con mayores tamaños de partícula, al igual que mayores proporciones de colesterol sobre DOTAP. B) Los valores más altos de polidispersidad se observan con mayor proporción de lípido ionizable ($N = 17$).

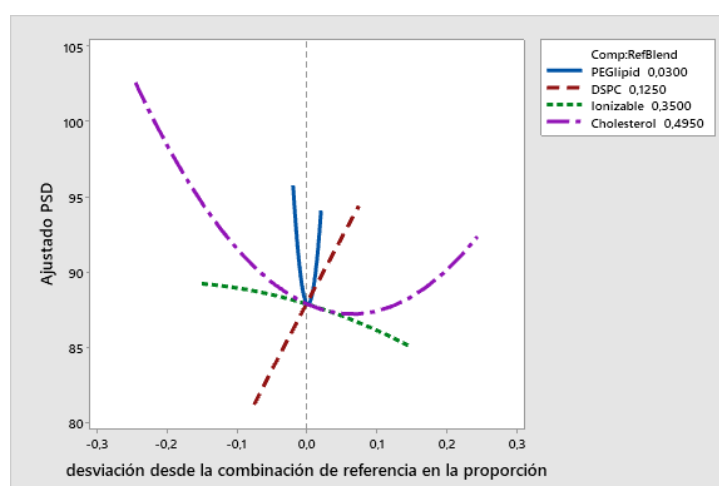


Figura 33: Gráfica de rastreo de respuesta de COX para los cambios en los componentes lipídicos

La gráfica muestra los impactos relativos de los cambios en el tamaño de partícula a partir de las proporciones de los componentes de referencia. Esta figura confirma la relación directa entre la concentración de DSPC y el tamaño, así como los efectos de cambios bruscos en la cantidad de colesterol ($N = 17$).

El análisis de componentes principales que se adjunta en el Anexo 1, Figura A 1; confirma resultados observados ya en la Figura 32 y la Figura 33., señalando el DSPC como el material con principal influencia en el tamaño de partícula y PDI, dentro de las concentraciones evaluadas y pruebas ejecutadas. Adicionalmente, pruebas preliminares demostraban precipitación al intentar superar el 12,5% de DSPC en solución de lípidos que tuvieran concentración total de 2,5 mM, indicando saturación.

De forma conjunta, los resultados de la sección 4.1.2.1 ilustran cómo los parámetros de composición de la fase lipídica, incluyendo tipo de lípido catiónico/ionizable, la concentración total de lípidos y las variaciones en la proporción de lípidos, afectan el tamaño de partícula y el PDI. Efectivamente, se observó que el uso de concentraciones de 25 mM en la preparación de la fase lipídica resultó en partículas más pequeñas y uniformes en comparación con las preparadas a 2,5 mM. Adicionalmente, utilizar DLin-MC3-DMA generó nanopartículas con un promedio de tamaño superior que las obtenidas si se utiliza DOTAP, pero sin variaciones significativas en el PDI. Los hallazgos del DoE de mezcla demuestran que pequeños ajustes de la formulación estándar pueden tener efectos significativos sobre las características físicas de las nanopartículas, particularmente si se corresponde a un aumento de DSPC.

4.1.2.2 Efecto de las soluciones tampón utilizadas para la manufactura y purificación de nanopartículas lipídicas

En un primer set de experimentos, se evaluó el efecto en la solución empleada como fase acuosa en el proceso de manufactura de las nanopartículas. Se probó el uso de tampón de citrato a pH 5,5 con concentraciones totales de 0,0115 mM y 5 mM, comparándolo con el uso del agua de forma ilustrativa (fabricar solo con agua no es apto para encapsular siRNA). Estos resultados se presentan en la Figura 34 y la Figura 35. Posteriormente se investigó la influencia de la composición y el pH de la solución tampón utilizada en la purificación de las nanopartículas (KCl, PBS, agua y no diálisis). Estos hallazgos se presentan en la Figura 36 y Figura 37. Para ambos conjuntos de pruebas se empleó la formulación base indicada en la Tabla 11 utilizando DOTAP y manteniendo una concentración de lípidos totales de 25 mM. Las condiciones de manufactura se conservaron uniformes con un flujo total de 3000 ± 300 mL/min y un FRR de entre 3 y 9.

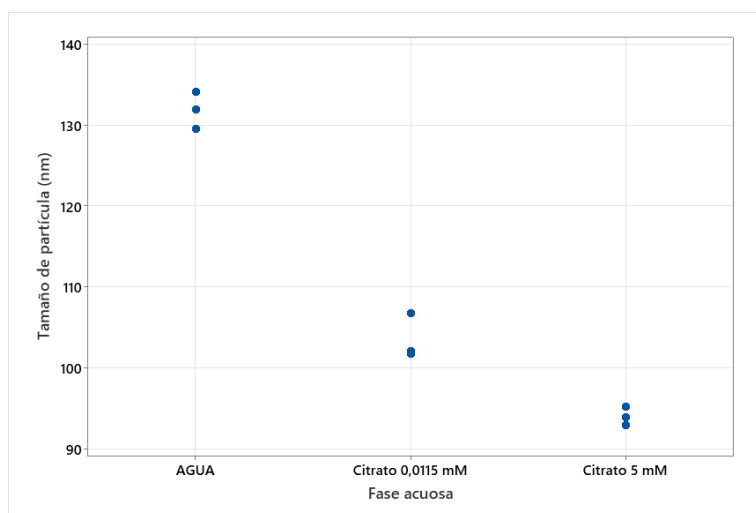


Figura 34: Influencia de la composición de la fase acuosa empleada en la fabricación de nanopartículas lipídicas por mezcla micro fluidica sobre el tamaño de partícula

Los resultados muestran que utilizando un tampón de citrato a una concentración de 5 mM para la preparación de la fase acuosa se obtienen los menores tamaños de partícula. Las diferencias observadas poseen significancia estadística (valor $p < 0,001$). Un análisis post-hoc con la prueba de Tukey reveló diferencias son significativas entre los tres grupos analizados (N=9).

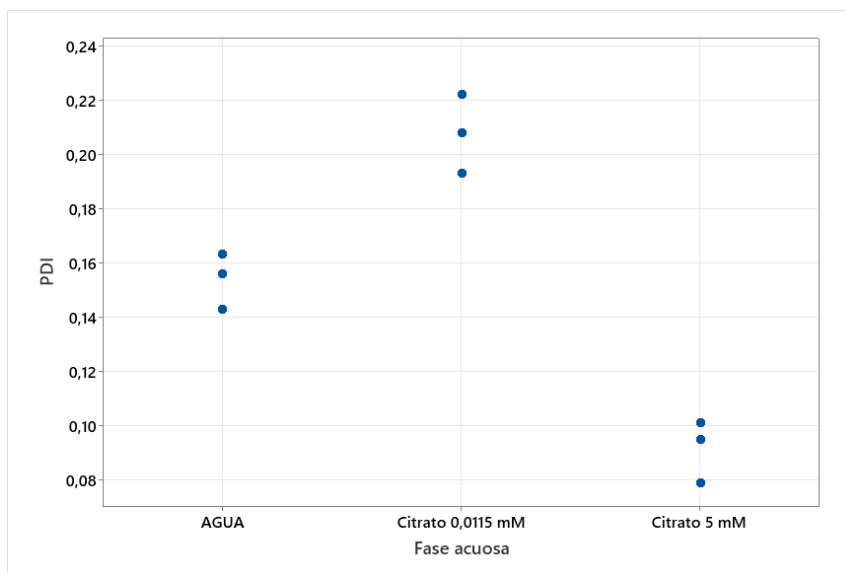


Figura 35: Influencia de la composición de la fase acuosa empleada en la fabricación de nanopartículas lipídicas por mezcla micro fluidica sobre el PDI

La mayor homogeneidad entre los datos analizados se observó cuando se utilizó tampón de citrato 5 mM. Mientras que, a diferencia de la tendencia observada con el tamaño, el valor intermedio se observó con agua, y los valores de PDI superiores con el tampón de citrato a menor concentración. Se observaron diferencias significativas (valor $p < 0,001$), y un análisis post-hoc con la prueba de Tukey reveló que diferencias significativas se observen entre cada uno de los tres grupos analizados ($N=9$).

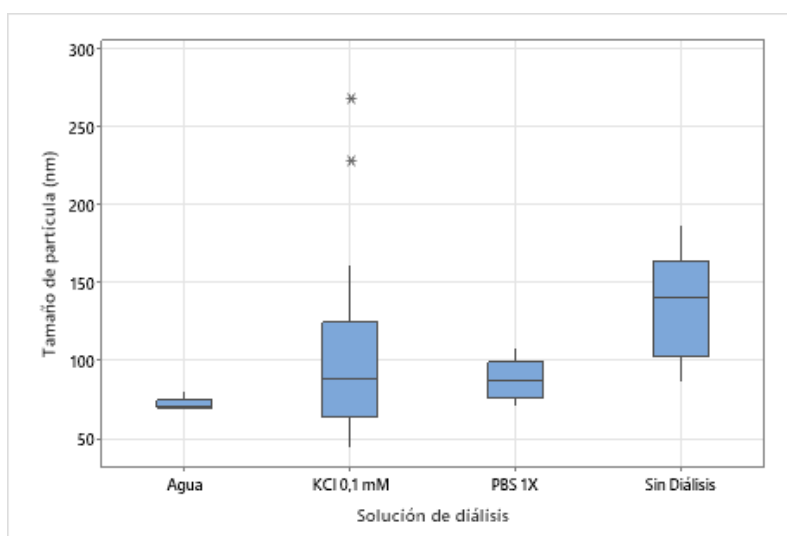


Figura 36: Comparación del tamaño de partícula obtenido tras la purificación de las nanopartículas con diferentes soluciones de diálisis

Se observa una reducción del tamaño de partícula en cualquiera de los casos en que se aplica diálisis, con datos relativamente más dispersos cuando se emplea KCl 0,1 mM que en el caso del PBS 1X. Análisis de varianza demuestra que al menos una de las medias es significativamente diferente a las demás (valor $p < 0,001$), mientras que un análisis post-hoc con la prueba de Tukey reveló que la diferencia se observa al no aplicar diálisis, mientras que las medias del agua, KCl 0,1 mM y PBS 1X no difieren significativamente entre sí ($N=105$).

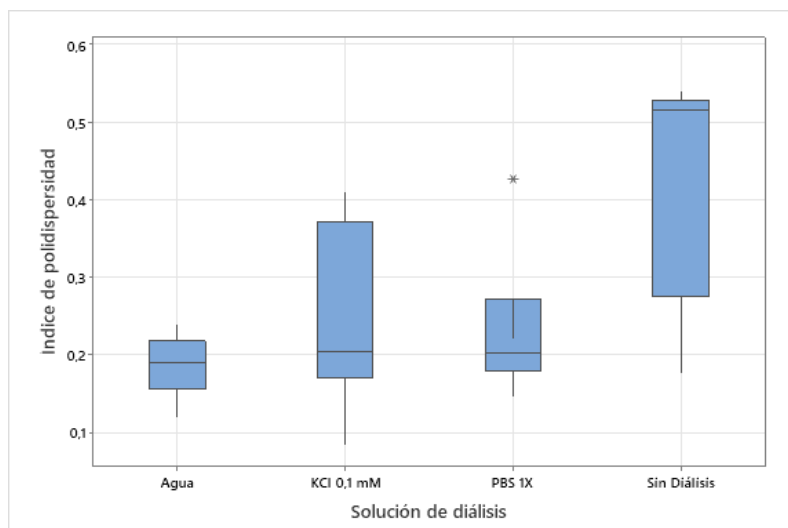


Figura 37: Comparación del PDI obtenido tras la purificación de las nanopartículas con diferentes soluciones de diálisis

Se observa un efecto de la diálisis, disminuyendo el PDI de forma consistente. Similar a lo observado con el tamaño de partícula, el análisis de varianza demuestra que al menos una de las medias es significativamente diferente a las demás (valor $p < 0,001$), y el análisis post-hoc con la prueba de Tukey reveló que entre los dos tipos de tampones analizados no existe diferencia significativa (ni con el agua), sino que la diferencia se da entre cualquier medio de diálisis y la media de las muestras donde no se realiza la diálisis ($N=105$).

Los resultados de esta sección muestran que tanto la solución tampón utilizada como fase acuosa para la fabricación de las nanopartículas como la empleada en su purificación (diálisis) influyen significativamente en el tamaño de partícula y PDI. Puntualmente, utilizar un tampón de citrato para la fase de fabricación emerge como la solución que permite un mayor control y menor tamaño de partícula. En cuanto a la diálisis, los resultados indican que ambas soluciones tampón proporcionan resultados comparables.

Cabe señalar que el estudio de la influencia de la diálisis realizado en esta tesis no solo reveló los efectos directos incluidos en esta sección, sino también su interacción con otros parámetros de proceso, específicamente el flujo total y la proporción de flujo. La profundización en el estudio de esas interacciones generó los resultados que se presentan en la siguiente sección. Por lo tanto, estos resultados adicionales deben también ser considerados para concluir sobre la influencia de la diálisis sobre los atributos de tamaño de partícula y el PDI.

4.1.2.3 Efecto del flujo total y la proporción de flujo en función de la diálisis

Los resultados presentados en esta sección incluyen un estudio del flujo total y el FRR, analizados en conjunto con la ejecución o no del proceso de diálisis y de cómo afectan los atributos de calidad de tamaño de partícula y PDI. Para este estudio se siguió el DoE descrito en la sección de 3.3.1.1.1. El desarrollo exhaustivo realizado durante las pruebas de formulación amplió significativamente la comprensión del proceso y sus interrelaciones, y fruto de ello se generó la publicación: *"Dialysis is a key factor modulating interactions between critical process parameters during the microfluidic preparation of lipid nanoparticles"*, publicado en la revista *Colloid and Interface Science Communications* (volumen 54, Mayo 2023, 100709) y que representa en sí misma uno de los aportes principales de esta tesis doctoral (Anexo 2). La Figura 38 a la Figura 43, y desde la Figura 48 a la Figura 50 son extraídas de dicha publicación.

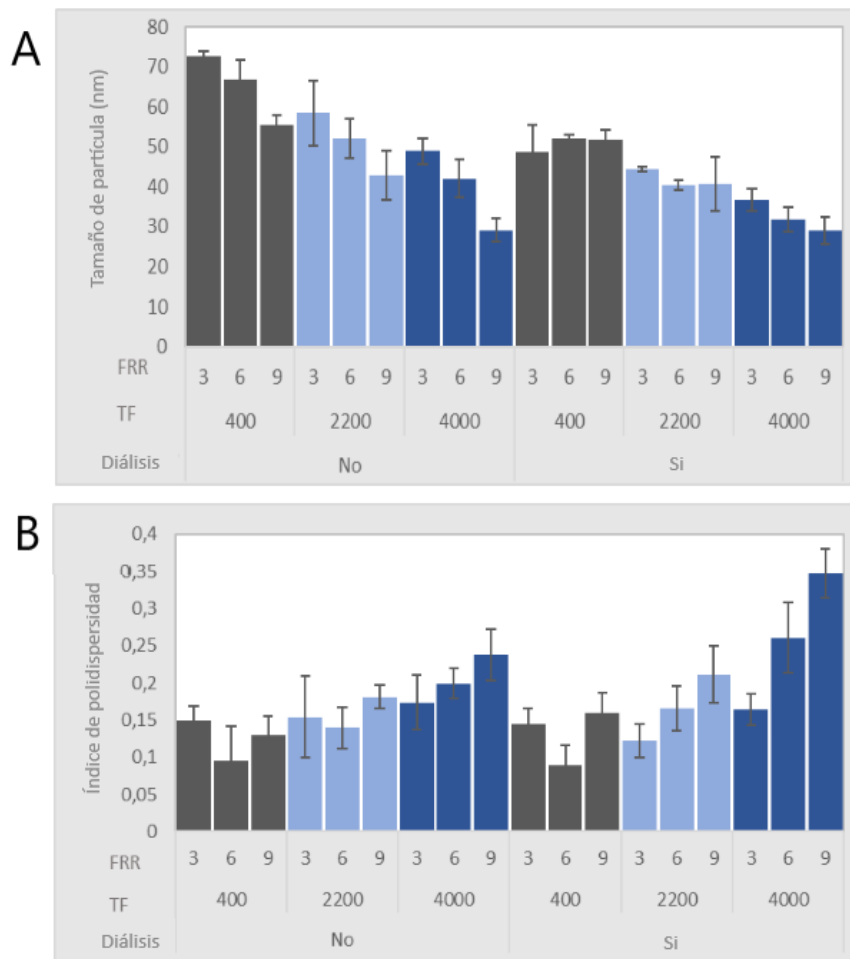


Figura 38: Efectos del flujo total (TF), la proporción de flujo (FRR) y la ejecución de diálisis sobre el tamaño de partícula y el PDI de nanopartículas lipídicas

A) La distribución del tamaño de las partículas mostró una tendencia a disminuir con valores más altos de TF y FRR. Las muestras dializadas mostraron menor tamaño y a su vez, menor variabilidad, en comparación con las muestras no dializadas. B) Los cambios en el PDI en relación al FRR mostraron una tendencia diferente a 400 mL/min en comparación con 2200 y 4000 mL/min, lo que sugiere una interacción entre esas dos variables (N=78). Figura modificada de (128).

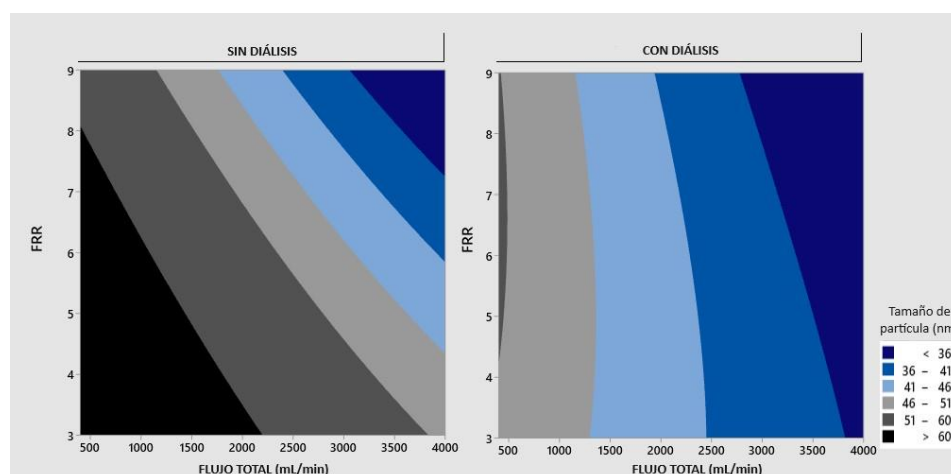


Figura 39: Diagrama de contorno de la distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas
La introducción de la diálisis modifica el efecto combinado del flujo total (TF) y de la relación de flujo (FRR) sobre el tamaño de las nanopartículas. El proceso de purificación implica tamaños medios de partícula más bajos y una influencia marcadamente reducida del valor FRR, lo que se evidencia en un mayor predominio del color azul y en la orientación más vertical de las líneas en el diagrama de la derecha (N=78). Figura modificada de (128).

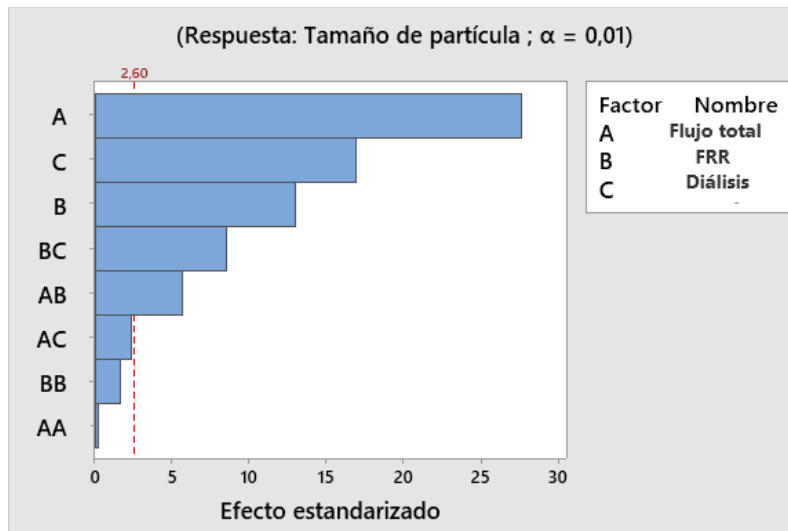


Figura 40: Gráficas de Pareto para los efectos estandarizados sobre el tamaño de partícula

Los efectos estandarizados para el tamaño de las partículas muestran efectos significativos para el flujo total (TF), la diálisis, la proporción de flujo (FRR), y las interacciones entre FRR*diálisis y TF*FRR, en orden descendente de contribución como descriptores de la variabilidad de los datos (valor $p < 0,001$). El límite de significancia por efecto estandarizado se encuentra en el valor 2,60 (línea roja). (N=78). Figura modificada de (128).

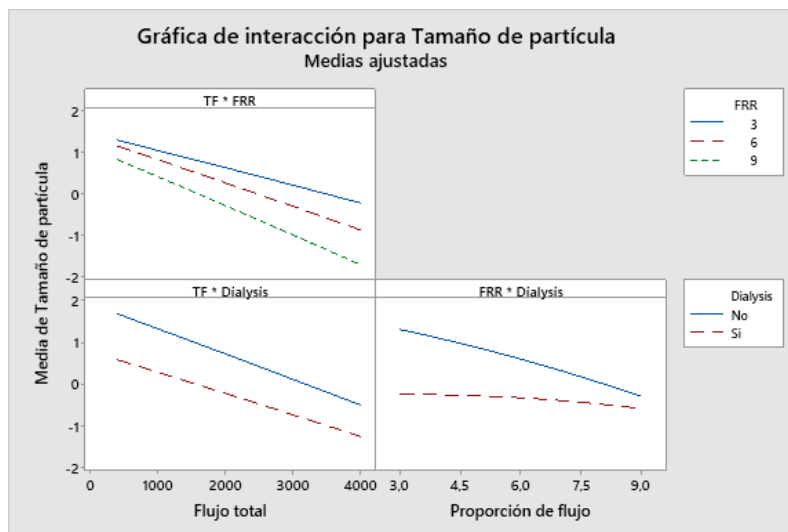


Figura 41: Gráficas de interacción sobre el tamaño de partícula

Cada línea individual representa el efecto principal de cada factor, en este caso ilustran la tendencia general a reducir el tamaño de partícula tanto con el aumento del flujo total como de FRR y la realización de la diálisis. La interrelación de los diferentes elementos permite visualizar e interpretar las interacciones entre factores. En este caso, este hecho es particularmente visible en el panel inferior a la derecha, donde se puede observar que la diferencia de inclinación entre la línea roja y la azul. Esto quiere decir que cuando no se ejecuta diálisis el tamaño muestra una tendencia a reducirse con el aumento del FRR, mientras que cuando se realiza diálisis la línea horizontal significa que en esa condición particular el FRR carece de influencia. (N=78). Figura modificada de (128).

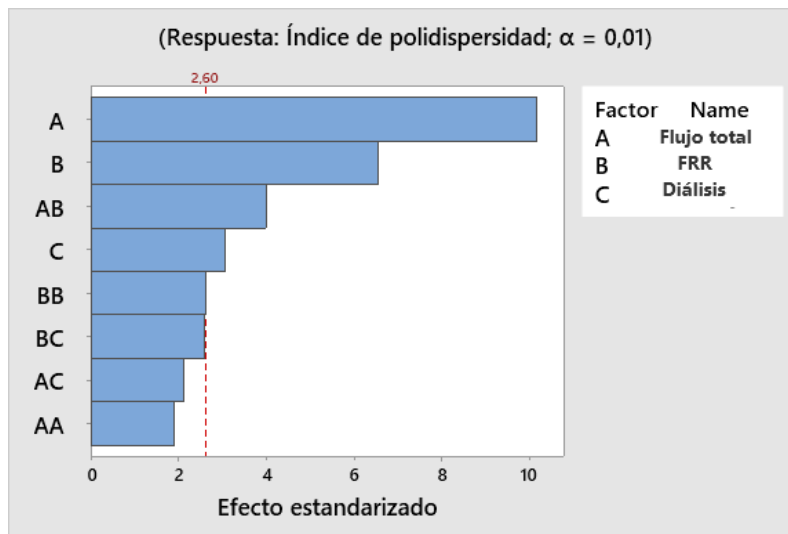


Figura 42: Gráficas de Pareto para los efectos estandarizados sobre el PDI

Los efectos estandarizados para el PDI muestran efectos significativos para el flujo total (TF), la proporción de flujo (FRR), la interacción entre TF*FRR, la diálisis y el efecto cuadrático del FRR, en orden descendente de contribución como descriptores de la variabilidad de los datos (valor $p < 0,001$). El límite de significancia por efecto estandarizado se encuentra en el valor 2,60 (línea roja). (N=78). Figura modificada de (128).

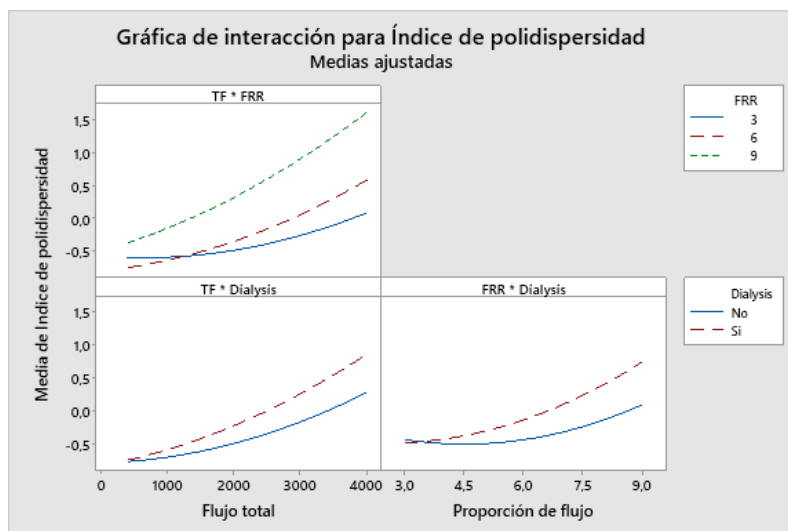


Figura 43: Gráficas de interacción sobre el PDI

Cada línea individual representa el efecto principal de cada factor, mostrando una tendencia general a aumentar el PDI tanto con el aumento del flujo total como de FRR y la realización de la diálisis. Particularmente, el panel superior ilustra una interacción significativa entre el flujo total y FRR, donde el PDI muestra diferencias más marcadas con cambios en el flujo total a un FRR de 9 (línea verde del panel superior). Las líneas de FRR 6 o 3 (las cuales se cruzan a valores bajos de flujo total) muestran una menor sensibilidad a cambios en el flujo total. Aunque los paneles inferiores podrían sugerir interacciones entre la diálisis y los otros factores, estas no cuentan con significancia estadística (valor $p > 0,05$). (N=78). Figura modificada de (128).

Los resultados de esta sección confirman los efectos del flujo total y FRR en el tamaño de partícula y PDI de las nanopartículas. Se encontró que flujos más altos favorecen la formación de partículas más pequeñas y que el impacto del FRR sobre este atributo se reduce dramáticamente con la ejecución de la diálisis.

Mientras que el efecto del TF concuerda con lo reportado en la literatura, la reducción significativa de la influencia del FRR debido a la diálisis representa un hallazgo novedoso y forma al eje central de la contribución de la publicación realizada en el marco de esta investigación (128). En el Anexo 2, sección 2, se encuentra disponible información suplementaria que proporciona visualización adicional y análisis estadístico detallada.

De manera más general, los hallazgos de la sección 4.1.2 permitieron explorar el espacio del diseño, profundizando el entendimiento de los resultados obtenidos dentro de límites de exploración, para esta formulación. Apuntando hacia nanopartículas con menor tamaño y mayor homogeneidad, los resultados de esta sección sugieren la utilización de fase lipídica con una concentración de lípidos totales de 25 mM, utilizar tampón de citrato a concentración de 5 mM durante la fabricación, y emplear valores más altos de TF, con un efecto del FRR notablemente reducido por la diálisis.

Con estos resultados se abordaron todos los parámetros señalados como críticos en el análisis de riesgos a excepción del tipo y diseño del chip. Este se define durante este desarrollo como un parámetro fijo (*Herringbone mixer chip*, *Chipshop*, código 10001931). Es importante mencionar que se probaron al menos dos diseños adicionales de chip, y aunque se observaron diferencias en los atributos medidos, esas pruebas no incluyeron condiciones consistentes de fabricación, por lo que la inclusión de más variables no controladas impidieron el establecimiento de datos robustos y concluyentes inequívocamente al diseño del chip. Por este motivo, se limitó el espacio del diseño al chip mencionado.

4.1.3 Estudios de formulación para optimizar el potencial zeta

Esta sección aborda el atributo crítico del potencial zeta, y su estudio a través de los parámetros de composición de la fase lipídica, efecto de las soluciones tampón, flujo total y proporción de flujo.

4.1.3.1 Efecto de la composición de la fase lipídica

Los efectos de la composición de la fase lipídica sobre el potencial zeta se estudiaron utilizando los mismo lotes fabricados para la sección 4.1.2.1 Por lo tanto, esta evaluación se basa en los mismos dos bloques experimentales definidos en dicha sección. En el primer bloque se exponen los resultados variando el tipo de lípido (DLin-MC3-DMA y DOTAP) y las concentraciones de lípidos totales (5 y 25 mM), y en el segundo un DoE de mezcla de vértices extremos.

La Figura 44 presenta los resultados de potencial zeta respecto al uso de DLin-MC3-DMA o DOTAP. No se muestran resultados correspondientes a la concentración de lípidos totales porque cuando se trata de un mismo lípido, no se observan diferencias estadísticamente significativas (valor $p > 0,05$). Por otra parte, la Figura 45 ilustra los cambios en el potencial zeta en función de los cambios en la proporción de componentes lipídicos.

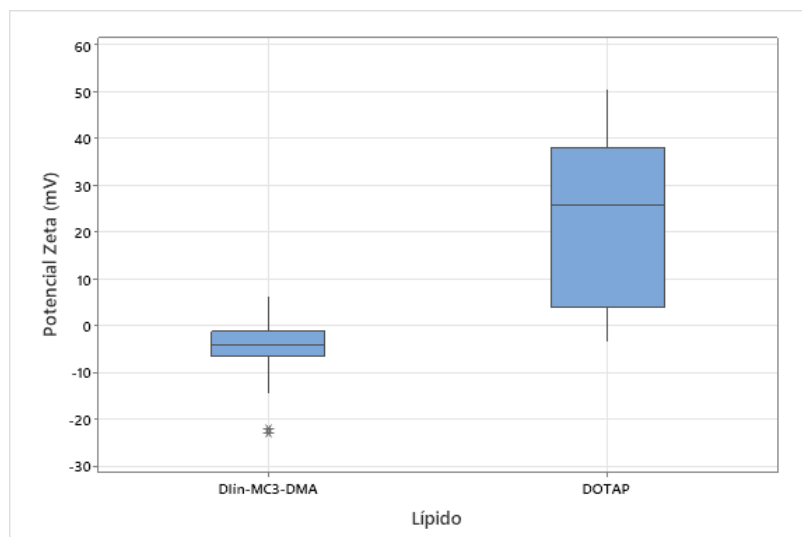


Figura 44: Comparación del potencial zeta obtenido en nanopartículas preparadas con diferentes tipos de lípido ionizable/catiónico

Se obtienen valores superiores de potencial zeta cuando se emplea el lípido catiónico DOTAP, mientras que cuando se utiliza el Dlin-MC3—DMA se obtienen valores negativos cercanos a la neutralidad. Las diferencias observadas son estadísticamente significativas (valor $p < 0,001$, $N=189$).

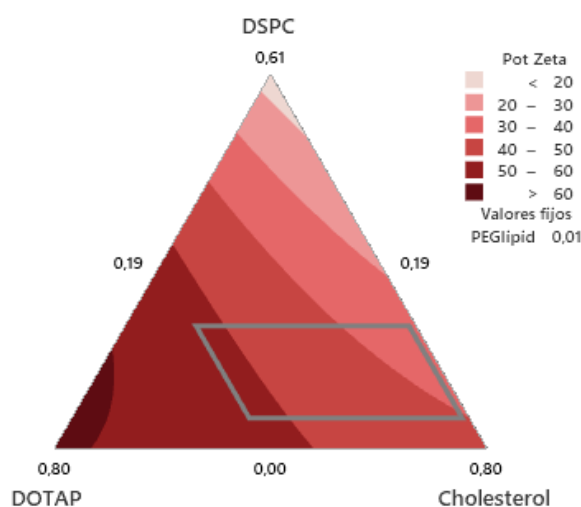


Figura 45: Efecto del cambio de proporción de los lípidos en el potencial zeta

La gráfica de contorno de respuesta observada en el DoE para los cambios en la mezcla de componentes de referencia: DSPC, Colesterol y DOTAP dentro de los rangos de proporciones descritos entre la base y el vértice del triángulo. La gráfica considera un valor fijo del lípido pegilado de 0,01. El aumento del DSPC correlaciona con valores de potencial zeta más bajos, así como la presencia de DOTAP con valores más elevados ($N=17$).

De forma conjunta, los resultados de los datos experimentales alrededor del potencial zeta señalan que este atributo es afectado principalmente por la naturaleza del lípido ionizable/catiónico empleado en la formulación, dando valores de potencial zeta superiores cuando se utiliza DOTAP en lugar de Dlin-MC3-DMA. También demuestran que la concentración total de lípidos en la fase etanólica no tiene influencia en este atributo de calidad. Adicionalmente, el análisis de componentes principales presentado en el Anexo 1, Figura A 1; identifica que el potencial zeta, en este estudio particular, está influenciado principalmente por la concentración de DOTAP, lo cual tiene sentido dada su naturaleza catiónica a pH neutro.

4.1.3.2 Efecto de las soluciones tampón utilizadas para la manufactura y purificación de nanopartículas lipídicas.

El efecto de las soluciones tampón utilizadas en la fabricación de nanopartículas se investigó variando la concentración del tampón de citrato utilizado como fase acuosa, ente 0,0115 mM y 5 mM. Estos resultados se presentan en la Figura 46. Además, se analizó el impacto de variar la solución tampón empleada para la purificación, entre: agua, KCl 0,1 mM o PBS 1X. Se obtuvieron los datos presentados en la Figura 47.

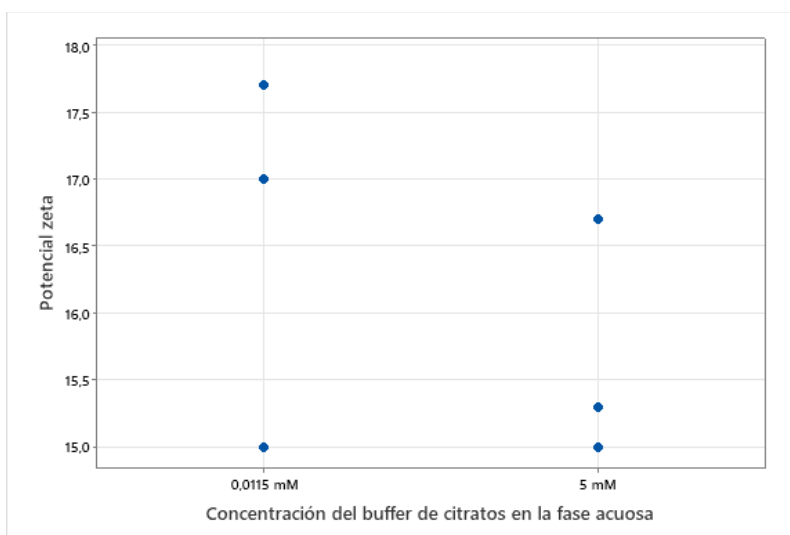


Figura 46: Influencia de la composición de la fase acuosa empleada en la fabricación de nanopartículas lipídicas por mezcla micro fluidica sobre el potencial zeta

Se observan valores relativamente más bajos y menos dispersos con la concentración de 5 mM. Sin embargo, el análisis de varianza indica que las diferencias observadas carecen de significancia estadística (valor $p > 0,05$) ($N=6$)

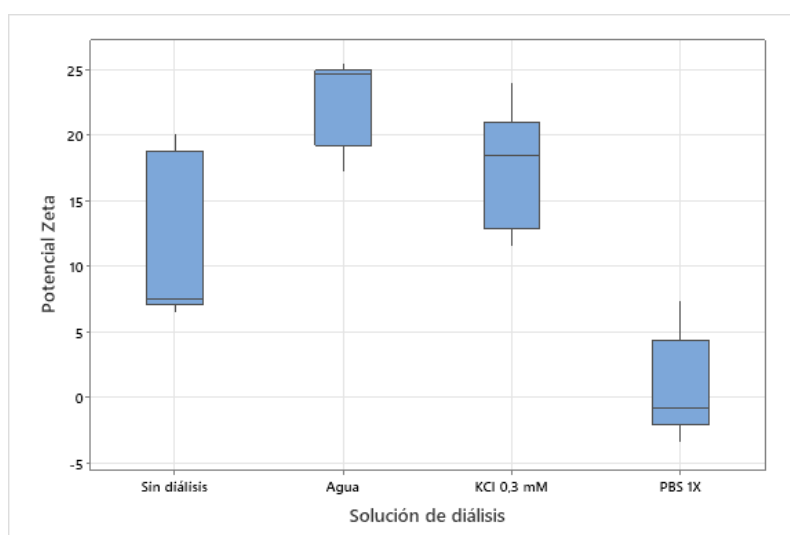


Figura 47: Comparación del potencial zeta observado tras la diálisis ejecutada con condiciones diferentes

La utilización de PBS 1X provoca potenciales zeta cercanos a la neutralidad aún en las nanopartículas lipídicas fabricadas con DOTAP, a diferencia de los observados con las otras condiciones evaluadas. El análisis de varianza señala que al menos una de las poblaciones posee una media distinta (valor $p < 0,001$). Análisis post-hoc con la prueba de Tukey señala que todas las condiciones arrojan medias significativamente distintas entre sí ($N=39$).

En ambas pruebas se empleó una fórmula con una concentración de lípidos totales de 2,5 mM, empleando DOTAP y las proporciones generales indicadas en la Tabla 11. Las condiciones de manufactura se mantuvieron constantes con un flujo total de 3000 ± 300 mL/min y un FRR de 3. Todos los lotes evaluados para el efecto de la fase acuosa de fabricación fueron sometidos a diálisis con KCl 0,1 mM. Para las pruebas realizadas en el estudio de la solución de purificación, los lotes fueron preparados empleando tampón de citrato con concentración de 0,0115 mM.

Los resultados muestran que, dentro de los niveles evaluados, el tampón de fabricación no posee influencia en el potencial zeta, a diferencia de lo observado con el tampón empleado para la purificación de las nanopartículas, en el que se obtienen menores valores cuando esta se realice con PBS 1X. La sección 4.1.3.3 muestra hallazgos adicionales respecto a los efectos de la ejecución de la diálisis en el potencial zeta, particularmente en su interrelación con el flujo total y el FRR. Esta información adicional debe ser considerada a la hora de concluir sobre la influencia de la diálisis en el atributo de calidad del potencial zeta.

4.1.3.3 Efecto del flujo total y la proporción de flujo en función de la diálisis

Al igual que con la sección 4.1.2.3, los resultados presentados en la Figura 48 hasta la Figura 50 también forman parte de la publicación: *"Dialysis is a key factor modulating interactions between critical process parameters during the microfluidic preparation of lipid nanoparticles"*, publicado en la revista *Colloid and Interface Science Communications* (volumen 54, Mayo 2023, 100709), y muestran los efectos que tanto el flujo total, la proporción de flujo (FRR) y la diálisis poseen en el potencial zeta. Estos resultados señalan que, de los parámetros estudiados, el proceso de diálisis tiene el mayor impacto en este CQA. Mientras que los resultados muestran que los valores altos de flujo total tienden a reducir el valor del potencial zeta, como se muestra adicionalmente en el Anexo 2 (sección 2, figura S8), una vez más se muestra que la influencia del FRR está influenciada por una interacción con el proceso de diálisis, reduciendo su relevancia como factor individual. De manera interesante, el efecto del FRR en el potencial zeta tiene una tendencia opuesta si se observan con o sin diálisis, como muestra la Figura 48 y la Figura 50.

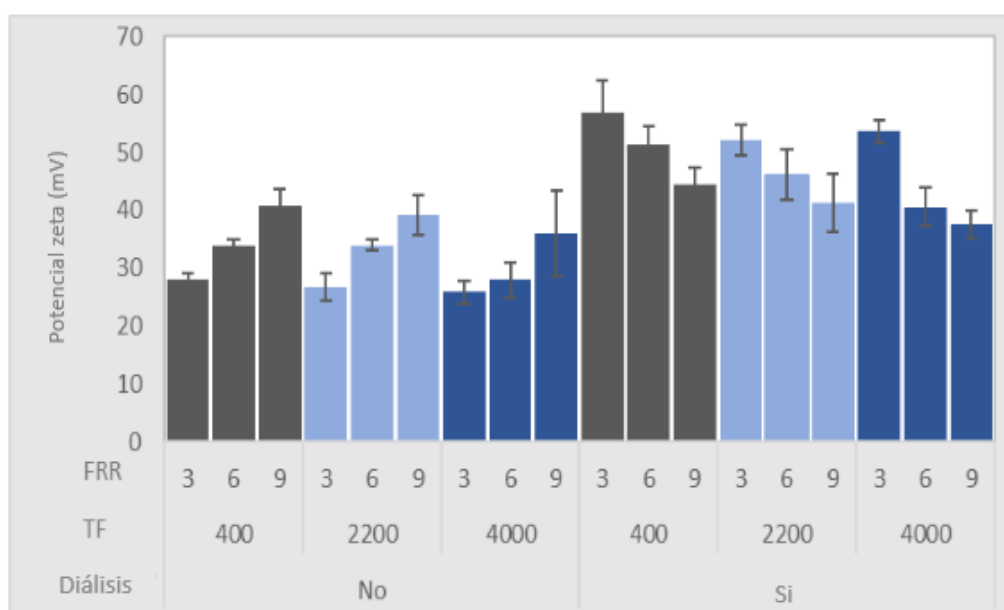


Figura 48 Efectos del flujo total (TF), la proporción de flujo (FRR) y la ejecución de diálisis sobre el potencial zeta
Las muestras dializadas mostraron valores de potencial zeta más elevados. Las diferencias debido al FRR mostraron tendencias opuestas con y sin diálisis, mientras que valores altos de flujo total (TF) implicaron valores más bajos de potencial zeta (visualización adicional en la Figura 50 y la Figura S8, Anexo 2-2) (N=78). Figura modificada de (128).

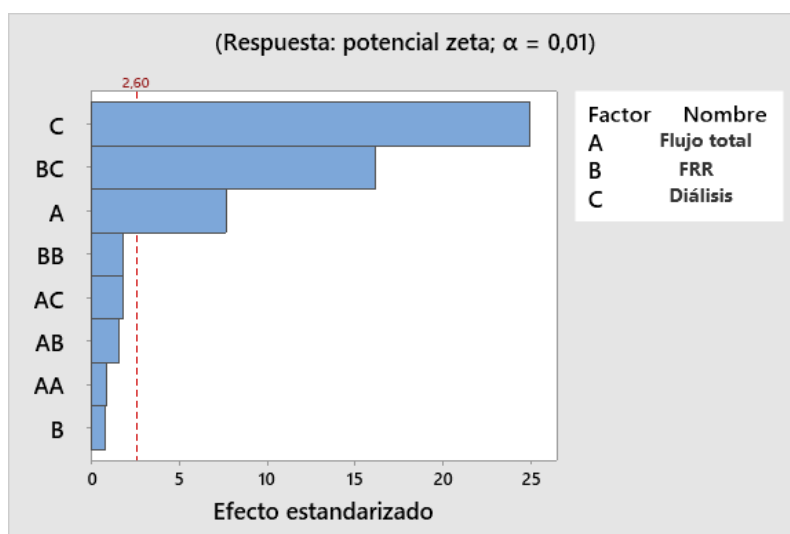


Figura 49: Gráficas de Pareto para los efectos estandarizados sobre el potencial zeta

Los efectos estandarizados de la diálisis, la interacción diálisis y el proporción de flujo (FRR) y el flujo total mostraron efectos significativos sobre el potencial zeta (en orden descendente de contribución). El límite de significancia por efecto estandarizado se encuentra en el valor 2,60 (línea roja). (N=78). Figura modificada de (128).

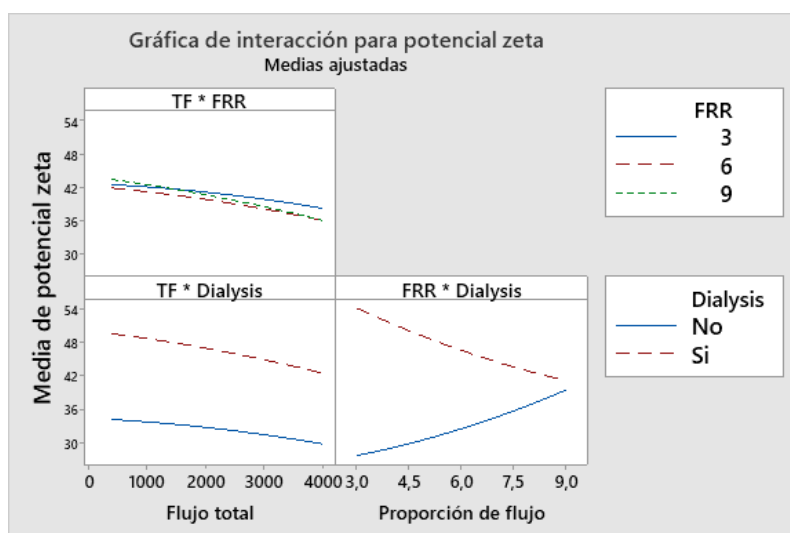


Figura 50: Gráficas de interacción sobre el potencial zeta

Las líneas del panel inferior derecho (que convergen en valores altos de FRR) muestran una fuerte interacción, ya que los efectos de la FRR dependen del proceso de diálisis. Las líneas que representan los efectos en el panel superior y el panel inferior derecho son casi paralelas, lo que representa que no hay interacción entre el TF y la diálisis, y el TF y el FRR. Los paneles de la izquierda ilustran claramente que el potencial zeta tiende a disminuir a valores altos de TF. Figura modificada de (128).

Los resultados de la sección 4.1.3 abarcan todos los parámetros críticos que, de acuerdo con el análisis de riesgos, poseen un riesgo alto por su impacto en el potencial zeta. De manera conjunta, sugieren que tanto la ejecución de la diálisis como la composición de la solución tampón ejercen una influencia predominante sobre el potencial zeta. Además, parecen indicar que la naturaleza del lípido ionizable/catiónico también tiene una influencia sobre el valor final. Mientras que utilizar DOTAP como lípido y KCl como solución tampón mostraron los valores más altos, la utilización de DLin-MC3-DMA y la purificación con PBS 1X mostraron valores más cercanos a la neutralidad.

4.1.4 Estudio de la eficiencia de encapsulación y contenido de RNA

Continuando con la exploración de los otros CQA incluidos en el análisis de riesgo realizado en la sección 4.1.1.2, esta sección muestra el efecto de la composición de la fase lipídica, la diálisis, el TF y el FRR en la eficiencia de encapsulación (EE).

4.1.4.1 Efecto de la composición de la fase lipídica

Conforme se describió en la sección 3.3.1.1.1, se implementó un segundo DoE de formulación para evaluar los efectos de la composición lipídica en la EE del RNA. Este correspondió a un diseño de mezcla de vértices extremos con 17 corridas, y se diseñó para explorar los efectos con un número reducido de puntos de diseño (en comparación con el DoE de la sección 4.1.4.1) por razones de costo. En todos los casos se aseguró una proporción nitrógeno/fosfato que no saturara la capacidad del lípido catiónico para formar complejos con el RNA. La influencia de los cambios en la composición de la fase lipídica sobre la EE de RNA se ilustra en la Figura 51.

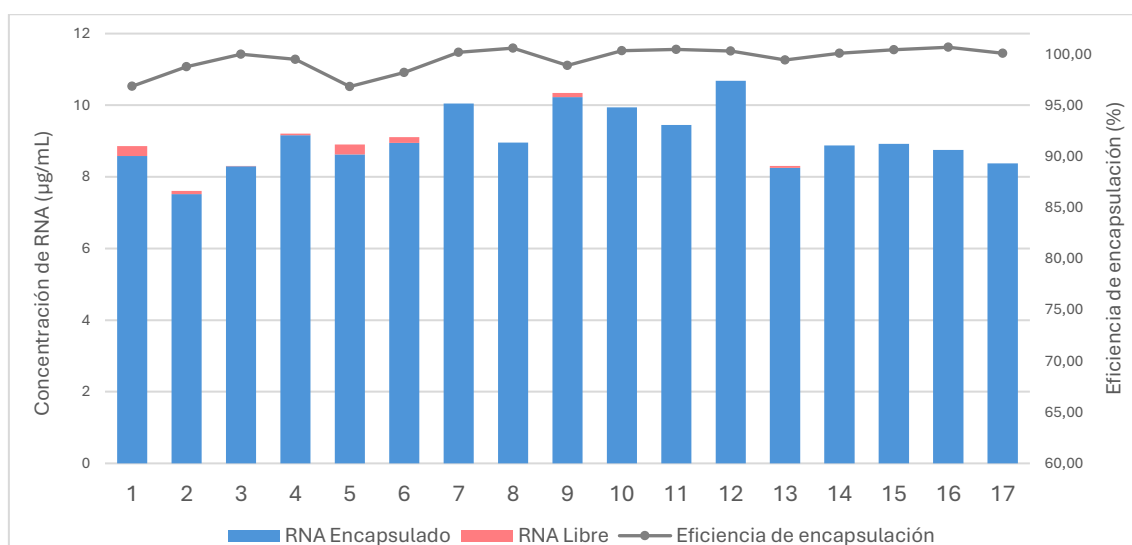


Figura 51: Efecto de la composición de la fase lipídica en la cantidad de RNA encapsulado y la EE

Se muestran los resultados individuales de la concentración de RNA, tanto encapsulado como libre (eje izquierdo) y la eficiencia de encapsulación (eje derecho) de los lotes del diseño de experimentos de mezcla. Cada uno de los 17 lotes posee una proporción de lípidos distinta (detalles de composición en el Anexo 1, Tabla A 3).

Los resultados de eficiencia de encapsulación mostraron valores promedio de $95,085 \pm 4,100$ %. Adicionalmente, pruebas preliminares demostraron que la concentración de la fase lipídica no mostró diferencias significativas en las condiciones evaluadas, mostrando siempre eficiencias de encapsulación promedio por encima del 92% (valor $< 0,05$, información adicional en la Figura A 2-E y Figura A 2-F del Anexo 1).

4.1.4.2 Efecto de la diálisis

En el contexto del DoE anterior, se seleccionaron cuatro lotes para evaluar la eficiencia de encapsulación y el contenido de RNA después de efectuar la diálisis con PBS1X. Específicamente los lotes 1, 5, 12 y 16, los cuáles fueron seleccionados al azar. Adicionalmente, se prepararon 3 lotes más empleando la composición base de la Tabla 11, y utilizando un contenido menor de RNA comparado con las muestras del DoE (2 µg/mL de contenido teórico, versus 16 µg/mL). Los resultados de estas dos evaluaciones del efecto de la diálisis en el contenido de la nanopartícula se reportan en la Figura 52.

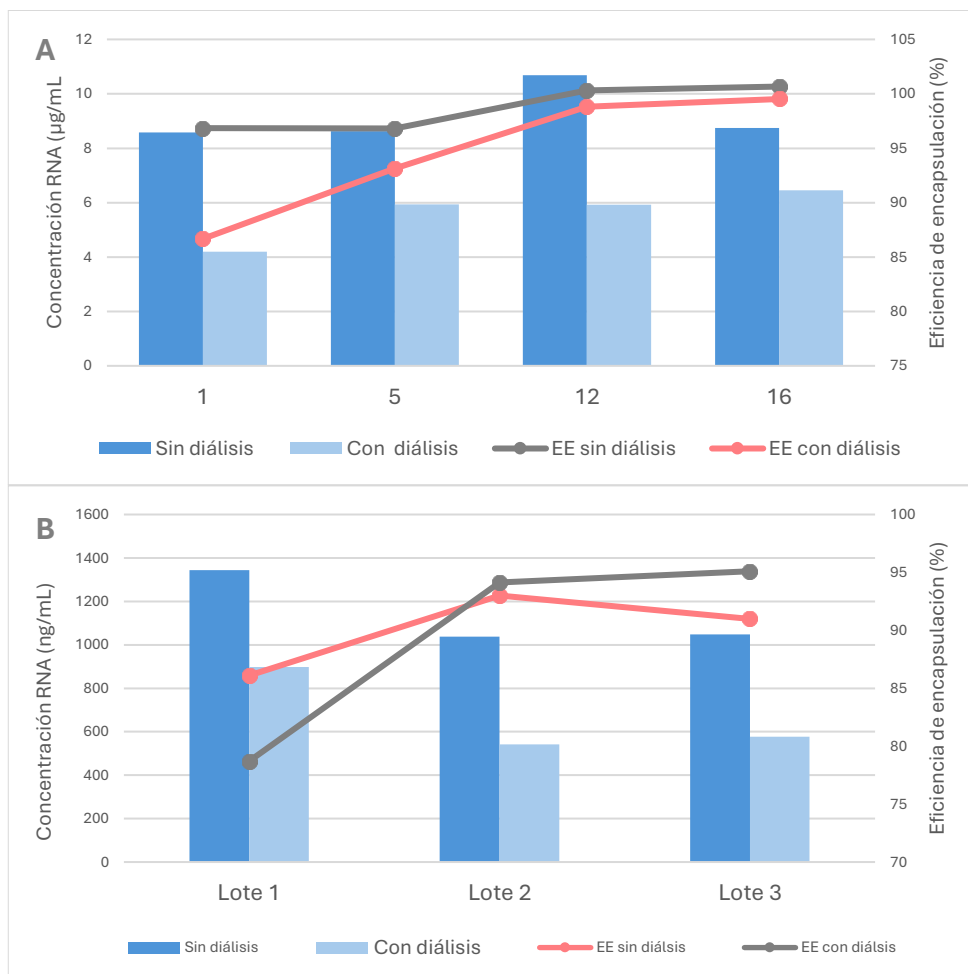


Figura 52: Efecto de la diálisis en el contenido de RNA y la EE

A) Comparación de la concentración de RNA y la EE y después de la diálisis para cuatro lotes seleccionados del DoE. La diálisis provoca una reducción considerable en la concentración de RNA absoluta, y una reducción moderada a baja en la EE calculada. B) En los tres lotes adicionales confirmatorios, preparados con un menor el contenido de RNA, se observa una reducción del contenido absoluto de proporción similar a la observada en el panel A. En cuanto a los valores de EE post-diálisis, estos tres lotes muestran variaciones en sus respuestas, mostrando tanto disminuciones como aumentos (la media de los tres lotes presenta valores similares con o sin diálisis).

En promedio, la media de los lotes dializados es aproximadamente un 5,05% inferiores a las muestras sin diálisis. Interesantemente, la reducción en términos absolutos es superior, y más llamativo aún es que las cantidades cuantificadas de RNA son considerablemente inferiores a las que podrían esperarse de acuerdo con la cantidad teórica agregada. Este hecho podría tener explicación debido a que la fórmula ampliamente aceptada para calcular la EE (Ecuación 4) refleja una imagen de lo que hay dentro y fuera y no toma en cuenta la cantidad preparada. Esto podría indicar que esta convención no es apta para principios activos que muestran inestabilidad fuera de las nanopartículas, como lo son los oligonucleótidos.

4.1.4.3 Efecto del flujo total y la proporción de flujo

Por otra parte, tanto el flujo total como la proporción de flujo no mostraron efectos significativos para la eficiencia de encapsulación ni para la eficiencia real, al aplicarse los factores de dilución apropiados (alícuota y proporción de flujo) (valor $p > 0,05$, ver Anexo 1, Figura A 2).

Los resultados obtenidos en esta sección indican que, a pesar de que los parámetros evaluados parecen no influir significativamente en la EE, de la forma en que este atributo se define

tradicionalmente en la literatura, se observaron discrepancias notables al considerar la concentración absoluta de RNA. De manera específica, sólo se encapsuló alrededor del 55-60% del RNA teóricamente agregado. Por una parte, esto sugiere que las estimaciones de contenido de RNA deben basarse en mediciones directas, o considerar un exceso proporcional al preparar las nanopartículas. Por otra parte, estos hallazgos cuestionan la metodología convencional para medir el EE, específicamente para los casos en que el principio activo puede hidrolizarse en solución (como es el caso del RNA). Esto sugiere la necesidad de reevaluar el abordaje de EE en el campo de vehiculización de oligonucleótidos para reflejar más fielmente la capacidad de carga del vehículo diseñado.

4.1.5 Establecimiento y especificaciones de la fórmula y proceso de fabricación del prototipo base de LNPs

El prototipo se estableció a partir de los resultados observados en las secciones anteriores. Con esta fase se culmina el proceso de exploración del espacio del diseño para las nanopartículas base (no modificadas) guiado por el análisis de riesgo y los principios de QbD. El prototipo de nanopartículas lipídicas propuesto satisface las especificaciones de calidad predeterminadas. El detalle de los parámetros de formulación y los valores de control para sus atributos de calidad se encuentran resumidos en la Tabla 36 y la Tabla 37. Adicionalmente, la sección 4.1.6 demuestra los resultados obtenidos en la evaluación de estabilidad de dicho prototipo.

Tabla 36: Definición del prototipo de nanopartículas lipídicas desarrollado

Parámetros de la formulación y del proceso de fabricación	Valor establecido
Composición de la nanopartícula	DLin-MC3-DMA, 40% DSPC, 10% DSPE-mPEG-2000, 1,5% Colesterol, c.s.p
Fórmula de la fase lipídica	Solución de lípidos en etanol a una concentración de 2,5 mM (Proporción de lípidos señalada en línea de Composición de la nanopartícula)
Fórmula de la fase acuosa	Solución de siRNA en tampón de citrato a 5 mM (cantidad de RNA suficiente para una tasa de nitrógeno/fosfatos de 3, dependiente de la masa molecular y número de nucleótidos del RNA)
Flujo total (TF)	3000 mL/min
Proporción de flujo (FRR)	3
Diálisis	PBS 1X

Tabla 37: Atributos de calidad del prototipo de nanopartículas desarrollado

Atributo de calidad	Valores obtenidos para el prototipo (lote de referencia 27-LSE0-002)
Tamaño de partícula	72,79 ± 5,68 nm
PDI	0,122 ± 0,040
Potencial zeta	-11,03 ± 0,12 mV
Apariencia (suspensión de nanopartículas)	Solución transparente
Apariencia (nanopartícula)	Partículas esféricas (ver figuras Y25 a la Y27)
Concentración de nanopartículas	Al menos (4,03 ± 0,47) x 10 ¹¹ /nanopartículas por mL (ver Anexo 1, Figura A 3)
Eficiencia de Encapsulación (tradicional)	> 90 %
Rendimiento de encapsulación (manufactura)	> 50%

Para el caso de las nanopartículas preparadas con DOTAP, los valores del prototipo de referencia (lote 12-PSE0-010) tienen tamaño de partícula $69,45 \pm 5,68$ nm, PDI $0,271 \pm 0,008$ y potencial zeta $30,50 \pm 2,39$ mV si se realiza la purificación con KCl 0,1 mM (potencial zeta de $2,11 \pm 1,87$ mV si se realiza la purificación con PBS 1X). Como se puede observar, se observan diferencias en los atributos de calidad de las nanopartículas con DOTAP en comparación con las que contienen Dlin-MC3-DMA. Por ejemplo, el valor de PDI en el lote 12-PSE0-010 sale de especificaciones, con un valor superior a 0,200. Por otro lado, cabe destacar las diferencias también observadas en relación con el potencial zeta (valores positivos en la formulación con DOTAP y valores negativos en la formulación con Dlin-MC3-DMA).

Las siguientes imágenes proporcionan una visualización detallada de las características morfológicas de las nanopartículas lipídicas, destacando su apariencia esférica que es esencial para su funcionalidad en aplicaciones biomédicas. Las Figuras 37 a 39 muestran micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM), que ilustran desde vistas generales de alta densidad hasta detalles específicos de aglomerados y reconstrucciones tridimensionales, ofreciendo así una apreciación profunda de la variabilidad en tamaño y la confirmación de la esfericidad de las partículas.

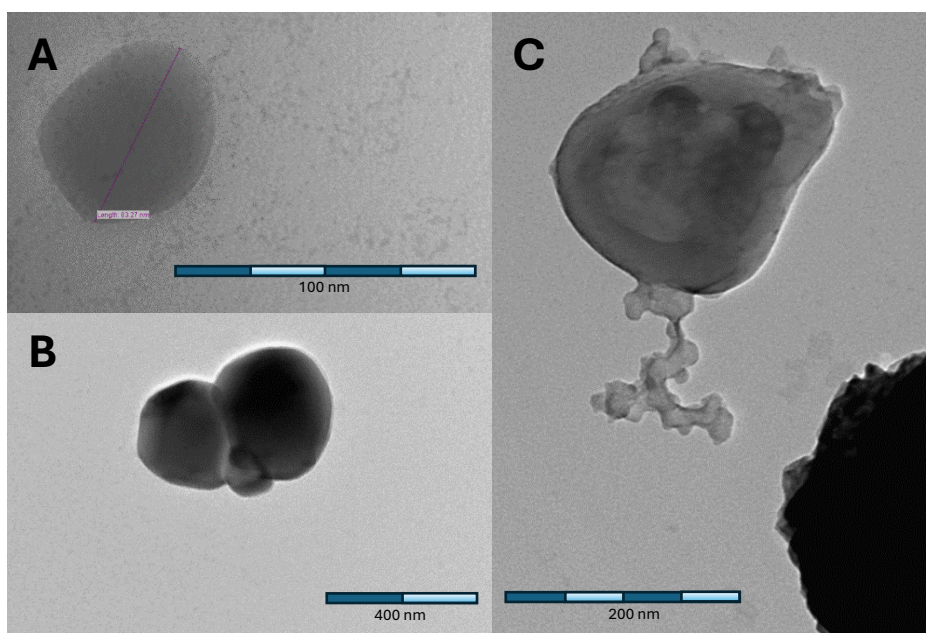


Figura 53: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas lipídicas

A) Imagen de una nanopartícula individual de 63,27 nm de diámetro. B) Aglomerado de 3 nanopartículas de aproximadamente 200 nm de diámetro. C) Imagen de una nanopartícula de alrededor de 200 nm con aglomeración de múltiples nanopartículas de menos de 20 nm de diámetro. La imagen demuestra la diversidad de formas y tamaños que pueden adoptar las nanopartículas lipídicas obtenidas.

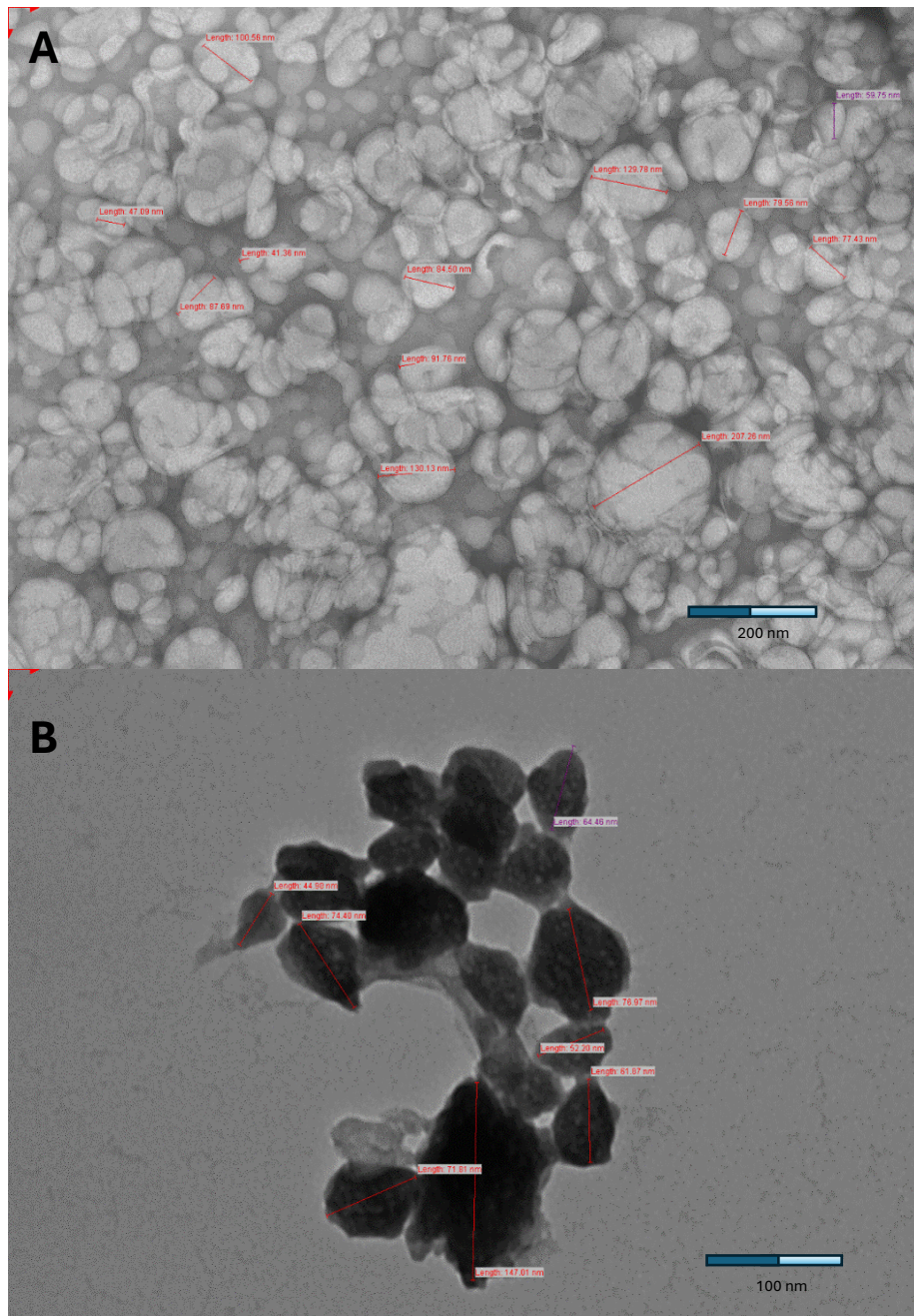


Figura 54: Imágenes TEM de las nanopartículas lipídicas

A) Vista general de una muestra con alta densidad de nanopartículas, donde se pueden apreciar tamaños desde los 47,89 nm hasta los 207,28 nm. Esta imagen saturada es con fines ilustrativos para apreciar la variabilidad general en el tamaño de partícula. B) Detalle de un aglomerado de nanopartículas con variabilidad de tamaños donde se destacan valores entre los 44,90 y los 147,01 nm.

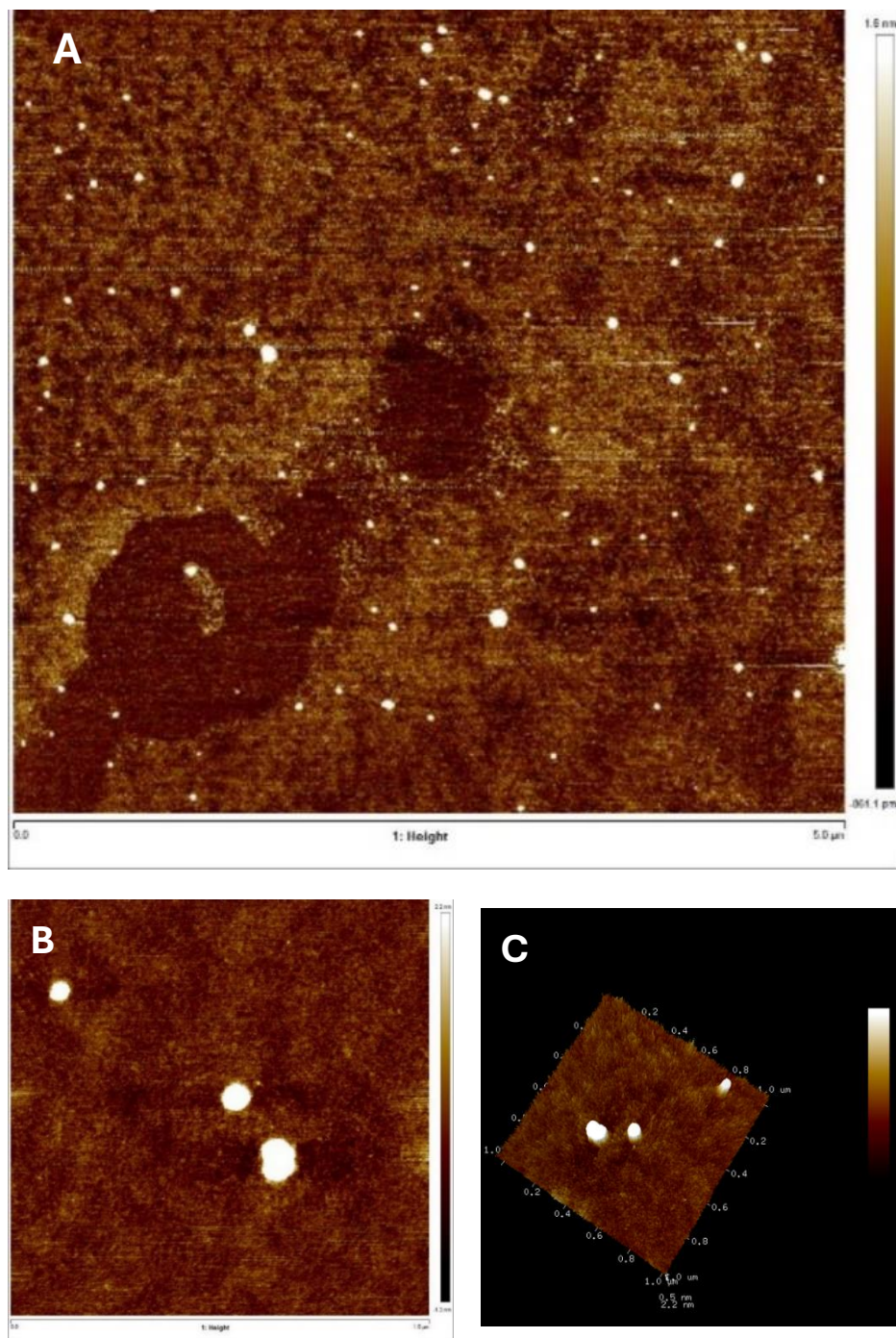


Figura 55: Imágenes de AFM de las nanopartículas

A) Presentación de un campo de $5 \times 5 \mu\text{m}$, donde se aprecian nanopartículas predominantemente esféricas con algunos aglomerados visibles. B) Acercamiento en un campo más restringido de $1 \times 1 \mu\text{m}$ donde se aprecia con mayor facilidad la morfología esférica de las nanopartículas. C) Reconstrucción tridimensional basada en el plano de B. La perspectiva en relieve confirma la esfericidad de las nanopartículas. El tamaño observado muestra consistencia con mediciones anteriores realizadas por DLS y microscopía electrónica con un promedio medido de $72,254 \text{ nm}$.

4.1.6 Estabilidad del prototipo

Con el establecimiento del prototipo de nanopartícula lipídica descrito en la Tabla 36 y la Tabla 37 se procedió a evaluar su estabilidad. De esta manera se fortaleció la lista de atributos indicada en la Tabla 37, ampliando el cumplimiento del QTPP. Las pruebas de estabilidad son necesarias para evaluar la aptitud de la nanopartícula para su uso en las etapas subsiguientes de la investigación, incluyendo las evaluaciones preclínicas contempladas en este proyecto. La estabilidad de las suspensiones de nanopartículas se evaluó bajo distintas condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente, 4 °C y -20 °C) durante un período de un mes, monitoreando el tamaño de partícula, el PDI y la eficiencia de encapsulación del RNA. Los resultados de estas evaluaciones se presentan de la Figura 56 a la Figura 59.

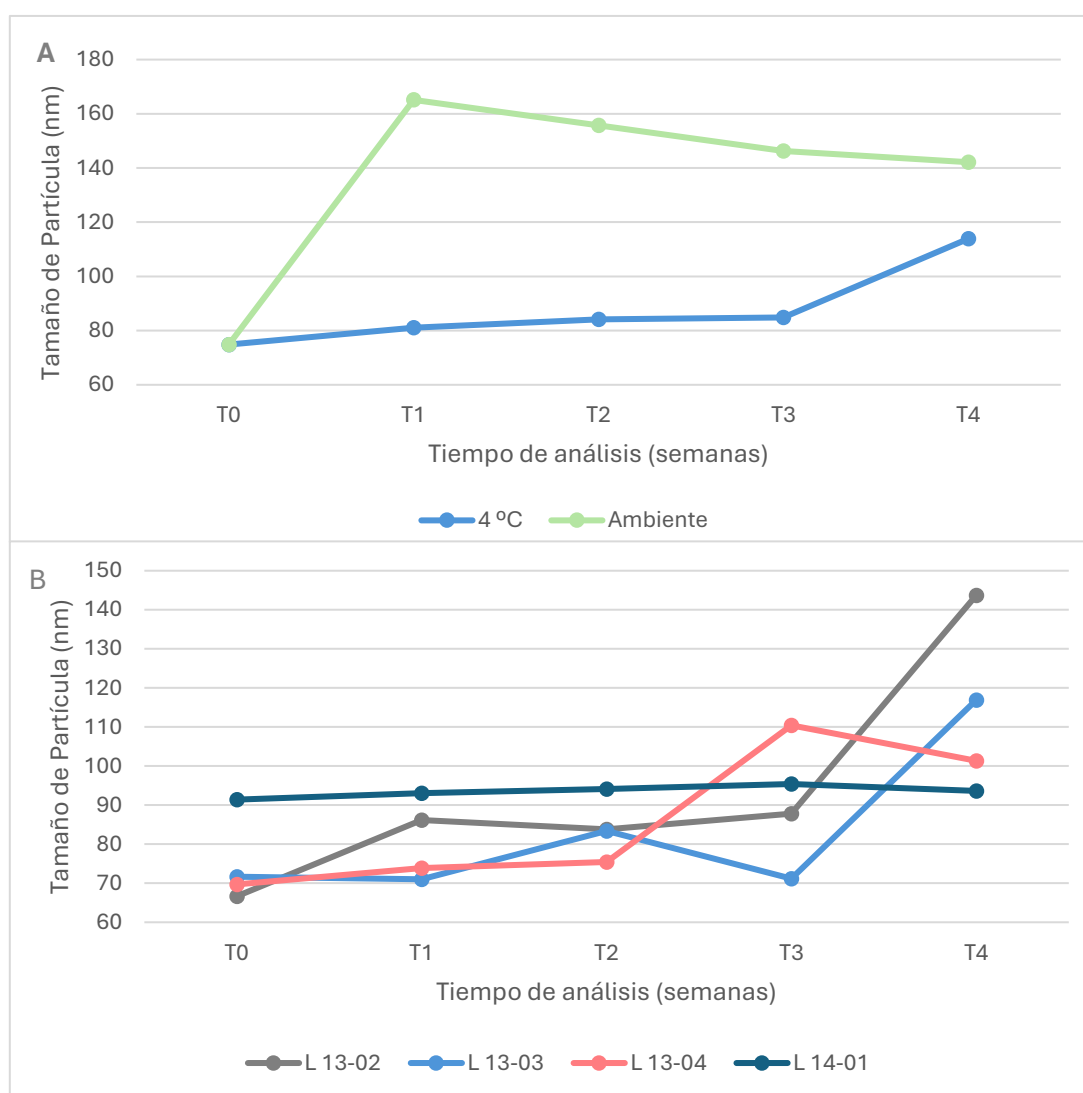


Figura 56: Tamaño de partícula durante el estudio de estabilidad de cuatro semanas

A) Muestra el tamaño de partícula promedio obtenido a 4 °C y los resultados promedios a temperatura ambiente. Las nanopartículas sometidas a congelación y descongelación sufrieron aglomeración irreversible. Mientras que los datos a temperatura ambiente muestran una tendencia a aglomerarse desde el tiempo cero, los datos en refrigeración muestran relativa estabilidad durante al menos tres semanas. B) Se muestran los datos de tamaño de partícula promedio de cada uno de los cuatro lotes empleados para evaluar la estabilidad.

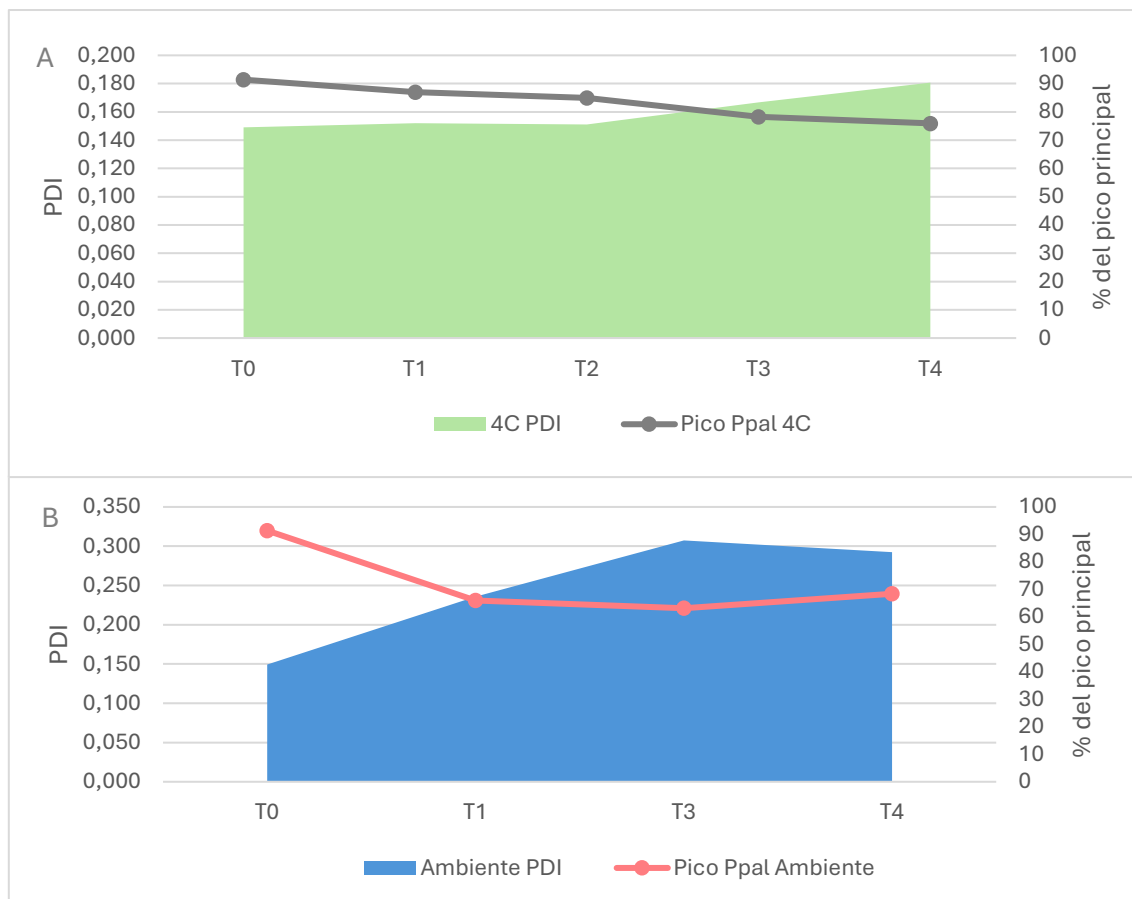


Figura 57: PDI durante el estudio de estabilidad de cuatro semanas

A) Evolución del PDI durante 4 semanas en condiciones de temperatura ambiente y a 4 °C. Mientras que los datos a temperatura ambiente muestran una tendencia a aglomerarse desde el tiempo cero, los datos en refrigeración muestran relativa estabilidad durante al menos tres semanas. Las nanopartículas sometidas a congelación y descongelación sufrieron aglomeración irreversible. B) Evolución del tamaño de partícula de cada uno de los cuatro lotes empleados para evaluar la estabilidad.

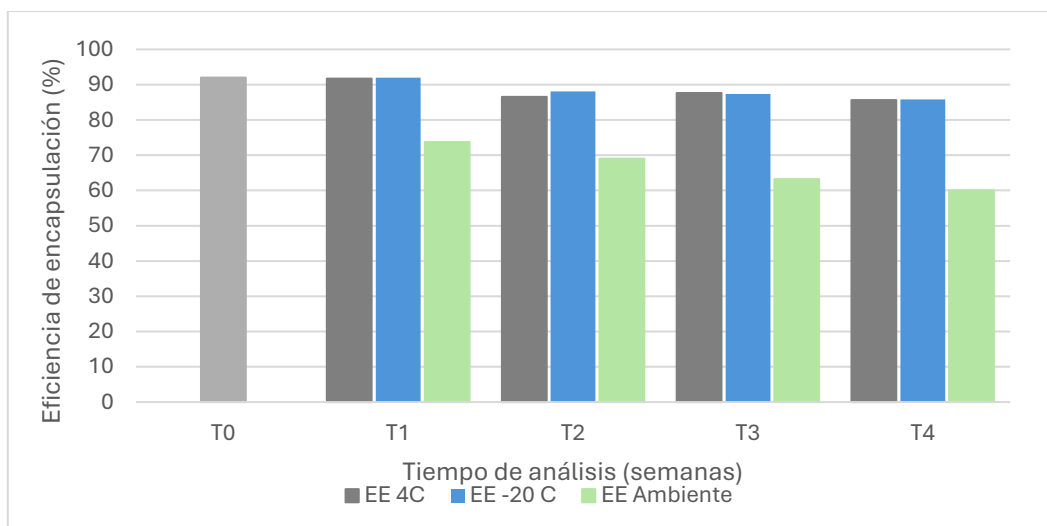


Figura 58: Eficiencia de encapsulación durante el estudio de estabilidad de cuatro semanas

Mientras que a temperatura ambiente se observa una caída considerable en la eficiencia de encapsulación, las muestras a 4 y -20 °C mostraron valores relativamente más estables. De manera notable, la estabilidad de la eficiencia de encapsulación a 4 °C es comparable la observada en condiciones de congelación.

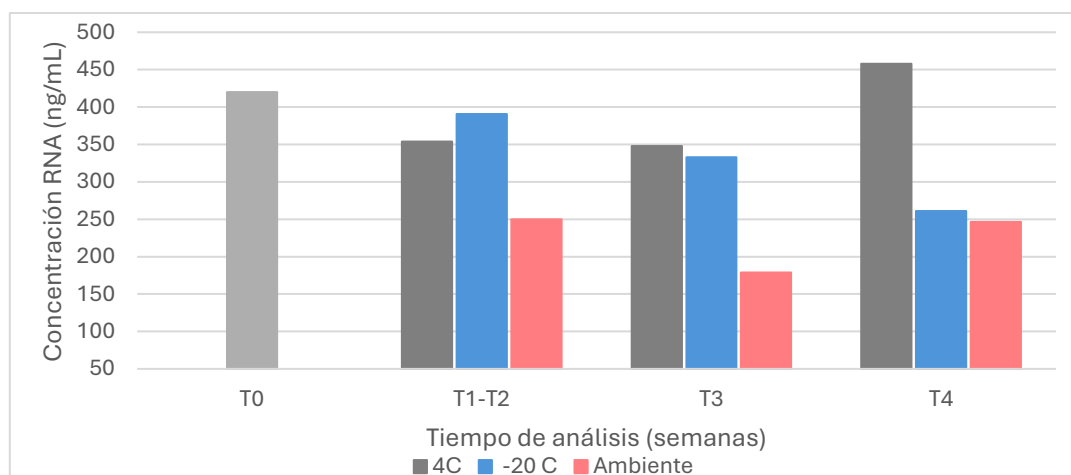


Figura 59: Concentración de RNA durante el estudio de estabilidad de cuatro semanas

A temperatura ambiente, la concentración de RNA disminuye desde el inicio del estudio, reflejando una pérdida significativa de material congruente con lo observado en la Figura 58. Por otra parte, las muestras almacenadas a 4 °C y -20 °C muestran una retención comparable y más estable de RNA, con disminuciones menos marcadas de aproximadamente 8,90% a las dos semanas y 20,62% a las tres semanas. A las cuatro semanas se obtienen mediciones inconsistentes debido a su variabilidad y comparación con los valores y tendencias anteriores.

Los resultados obtenidos en la evaluación de estabilidad del prototipo muestran que las condiciones de almacenamiento a 4 °C son suficientes para preservar las características evaluadas en la formulación hasta por tres semanas, incluyendo la integridad del RNA. Se destaca que la protección al RNA a esa temperatura es comparable con la protección observada en condiciones de congelación, la que a su vez muestra ser no apta para mantener el tamaño de las nanopartículas por aglomeración irreversible en el ciclo de congelación/descongelación en condiciones no controladas y sin crioprotección. A nivel de EE y contenido total de RNA, se observa que las condiciones de almacenamiento a 4 °C también protegen el RNA de degradaciones significativas. Estos resultados apoyan el uso de estas condiciones de refrigeración para la conservación de las muestras de manera práctica durante pruebas de laboratorio preclínicas.

Ante los cuestionamientos descritos en la sección 4.1.4 sobre la aptitud del enfoque tradicional para calcular EE, y la observación del rendimiento de RNA en términos de cantidad agregada, el resultado obtenido en cuanto a concentración absoluta de RNA (Figura 59) durante el período de evaluación representan una confirmación de la aptitud de la nanopartícula como vehículo para el RNA. Es de especial importancia para poder concluir que cualquier pérdida de RNA observada puede deberse más a variaciones del proceso de fabricación, que a una deficiencia en la capacidad protectora de la nanopartícula. De esta manera se refuerza la confianza en el vehículo diseñado y su aplicación para la vehiculización de RNA.

4.2 Funcionalización de las nanopartículas lipídicas

El proceso de desarrollo descrito en la sección 4.1 dio como principal resultado el prototipo presentado y caracterizado en la Tabla 36 y la Tabla 37. Este constituye la base para la siguiente fase: la funcionalización con péptidos para el transporte activo a través de la BHE. Esta funcionalización se sustenta en la reacción que puede realizarse entre un aminoácido cisteína terminal en la estructura de los péptidos, con grupos maleimida en la superficie de las nanopartículas. Por lo tanto, el primer paso en esta etapa de funcionalización es la modificación de la formulación original para agregar el lípido funcional que permita la expresión superficial de esta maleimida para que sirva de anclaje para agregar los péptidos.

De acuerdo con el análisis de riesgo presentado en la

Tabla 19 y en la Tabla 29, los parámetros críticos de proceso que representan un riesgo alto y están asociados a estas modificaciones son el tipo y el porcentaje de lípido maleimida. Más adelante, al abordar la funcionalización misma, se examinarán los parámetros de la proporción maleimida/péptido, la composición del medio de incubación y el tiempo de incubación para la funcionalización.

4.2.1 Modificación del prototipo para agregar el lípido maleimida.

Tres diferentes lípidos funcionales, con modificaciones estructurales que incluyen grupos maleimida, fueron preseleccionados durante una revisión bibliográfica: DSPE-mPEG-Maleimida, DSPE- Maleimida y el Colesterol-mPEG-Maleimida (o DSPE-mPEG-MAL, DSPE- MAL y el Colesterol-mPEG-MAL, respectivamente). Se evaluó el impacto que la incorporación de estos materiales tiene sobre los CQA de la nanopartícula base. Este impacto se evaluó en tres niveles distintos de concentración en la sección 4.2.1.1.

Adicionalmente, para poder discernir cuál de estos excipientes resulta más eficiente en términos de disponibilidad para la funcionalización se introdujo un nuevo atributo crítico de calidad: la disponibilidad superficial de maleimida. Para poder medir apropiadamente este atributo, se desarrolló una metodología específica que permite evaluar la distribución y disponibilidad de la maleimida en la formulación, abordado en las secciones 4.2.1.2 y 4.2.1.3.

4.2.1.1 Impacto de la adición del lípido funcional sobre el tamaño de partícula, el PDI, y potencial zeta del prototipo

Los efectos en el tamaño promedio de partícula y el PDI se evaluaron a través de la fabricación de lotes de nanopartículas incluyendo tres lípidos distintos (DSPE-mPEG-Maleimida, DSPE-Maleimida y Colesterol-mPEG-Maleimida), cada uno en las concentraciones de 2%, 5% y 10% en la formulación. Los valores promedio obtenidos en cada medición se presentan en la Figura 60 y la Figura 61.

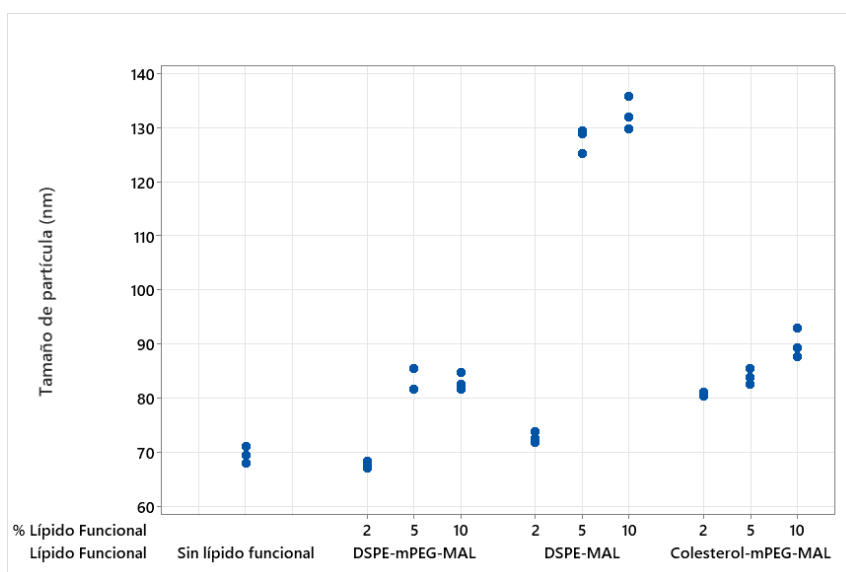


Figura 60: Impacto de la incorporación de lípido funcional en el tamaño de partícula

Se muestran los cambios en el tamaño de partícula al agregar 2, 5 y 10% de cada uno de los 3 lípidos funcionales a evaluar. El análisis de varianza indicó diferencias significativas en el tamaño de partícula para al menos un tipo de lípido (valor $p < 0,001$) y al menos uno de los porcentajes utilizados (valor $p < 0,01$). Un análisis post-hoc con la prueba de Tukey identificó las diferencias significativas específicamente para las muestras fabricadas con DSPE-Maleimida, y a aquellos que utilizan una concentración de 10% independientemente del lípido ($N=30$).

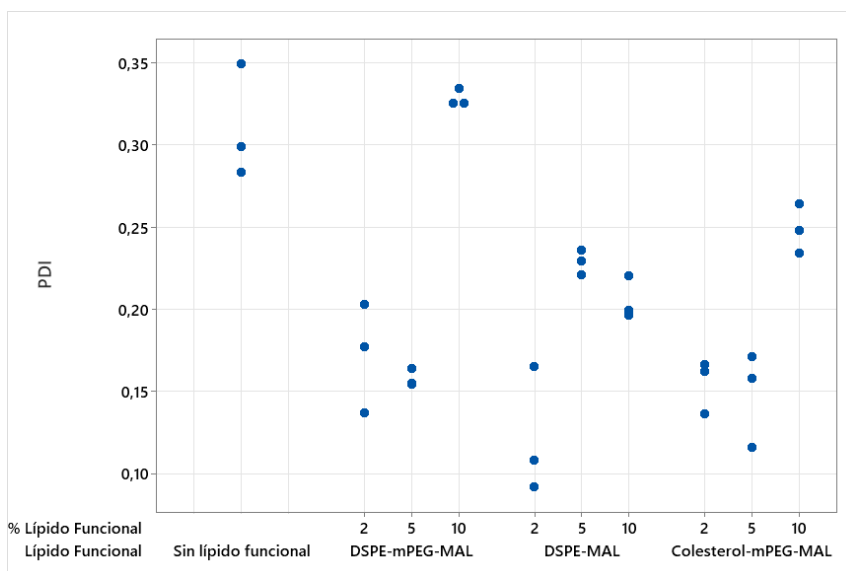


Figura 61: Impacto de la incorporación de lípido funcional en el PDI

Se muestran los cambios en el PDI al agregar 2, 5 y 10% de cada uno de los 3 lípidos funcionales a evaluar. El análisis de varianza demostró diferencias significativas para al menos un tipo de lípido funcional (valor $p < 0,05$), mientras que el análisis post-hoc con la prueba de Tukey permite agrupar los valores de PDI de las nanopartículas sin funcionalizar y las que emplean DSPE-Maleimida, por un lado, y un segundo grupo de resultados comparables con el DSPE-mPEG-MAL y el Colesterol-mPEG-Maleimida. Respecto al porcentaje de lípido agregado, existen diferencias estadísticamente significativas (valor $p < 0,001$) específicamente en las nanopartículas fabricadas con un 10% de lípido funcional ($N=30$).

Las muestras empleadas para las evaluaciones presentadas en la Figura 60 y la Figura 61 fueron fabricadas conforme la fórmula prototipo especificada en la Tabla 11. Para cada lote, se incorporó el lípido funcional en los porcentajes indicados, ajustando proporcionalmente la cantidad de colesterol. Las condiciones de fabricación se mantuvieron constantes con un flujo total de 3000 ± 300 mL/min y un FRR de 3. Antes de realizar las mediciones las nanopartículas fueron sometidas a diálisis usando PBS 1X.

Una diferencia de comportamiento adicional entre estos tres excipientes se puede observar si se comparan los valores de tamaño de partícula de estos lotes con y sin diálisis (ver Anexo 1, Figura A 4). Cuando se utilizan los excipientes DSPE-mPEG-Maleimida y el Colesterol-mPEG-Maleimida, se observan diferencias de tamaño de partícula de alrededor de 20 nm, mientras que cuando se emplea el DSPE-Maleimida se observa una diferencia más pronunciada ($55,91$ nm, resultado de comparar $128,63 \pm 1,91$ nm versus $72,72 \pm 0,49$ nm). Por otra parte, en términos del potencial zeta, los análisis no revelaron diferencias significativas entre los diferentes lípidos o porcentajes evaluados (valor $p > 0,05$), como se puede apreciar en el Anexo 1, Figura A 5.

4.2.1.2 Desarrollo metodológico para cuantificar la maleimida disponible

La sección anterior ilustra cómo la incorporación de diferentes lípidos funcionales impacta los atributos de calidad más críticos hasta la realización del análisis de riesgo. Sin embargo, no permite evaluar los diferentes lípidos desde el objetivo primario de su inclusión: la disponibilidad en la superficie de las nanopartículas de maleimida para su posterior funcionalización. Para ello, era indispensable contar con una metodología que permitiera cuantificar este grupo funcional.

Inicialmente se aplicó la prueba de Ellman para poder cuantificar la maleimida. Esta prueba permite medir la maleimida de manera indirecta, al incubarse con un exceso de cisteína para que posteriormente dicha cisteína en exceso reaccione con el reactivo de Ellman, produciendo así un complejo coloreado cuantificable por espectrofotometría ultravioleta-visible (sección 3.2.3.8).

Los resultados obtenidos con este método no fueron robustos ni reproducibles, presentando problemas de baja reproducibilidad, con una desviación estándar relativa en el contenido de maleimida por lote de nanopartículas superior al 71% (ver Anexo 1, Tabla A 4). Además, datos experimentales con lípido maleimida puro mostraron poca correlación entre la cantidad pesada y la respuesta analítica. Los resultados, por lo tanto, sugieren una baja eficacia en la cinética de las reacciones involucradas en la ejecución de la técnica (ver Anexo 1, Figura A 6 y Figura A 7).

Debido a las interferencias detectadas, se decidió explorar el desarrollo de un método analítico que permitiera detectar la maleimida y sus señales analíticas con los equipos disponibles en el laboratorio, priorizando soluciones que no fueran laboriosas ni costosas. Durante las pruebas, se observó que al menos algunos de los componentes de las nanopartículas absorbían luz ultravioleta. Este hecho, inspirado adicionalmente en datos bibliográficos, dirigió el desarrollo analítico hacia un método HPLC-UV. El potencial de la técnica, dependiente también del tratamiento de las muestras, abre la posibilidad de no solo cuantificar la maleimida disponible para funcionalización, sino lograr trazar la ubicación del lípido funcional no incorporado en la superficie, tanto el que se pierde en la suspensión como el que podría quedar en el interior de la nanopartícula.

Para el desarrollo del método se fueron inyectando de forma individual, soluciones etanólicas de cada uno de los excipientes empleados en la fabricación a una concentración de 1 mM. El objetivo era lograr encontrar una señal analítica correspondiente a cada material, con tiempos de retención distintos para que, en una muestra compuesta por los distintos materiales, no se solaparan sus picos entre sí, ni con las impurezas o solventes empleados. A partir de referencias bibliográficas que presentaban la separación de componentes lipídicos de nanopartículas, se empezaron a ensayar diversas condiciones experimentales que se resumen en la Tabla 38 y la Tabla 39. La Tabla 40 presenta los tiempos de retención que se obtuvieron para cada componente de la fórmula en cada una de las condiciones evaluadas.

Tabla 38: Condiciones analíticas experimentadas en el desarrollo del método de evaluación de la composición de las nanopartícula lipídicas

Método	Composición de la fase móvil				
	Metanol	Agua	Isopropanol	Acetonitrilo	Solución Tampón
1	40	60	-	-	-
2	10	-	90	-	-
3	25	30	45	-	-
4	42	60	18	-	-
5	16	12	72	-	-
6	25	30	45	-	-
7	13	6	81	-	-
8 y 9 ¹	19	18	63	-	-
10	-	-	-	80	20
11	-	-	-	60	40
12	-	-	60	30	10
13	-	-	70	20	10
14	-	-	50	40	10
15	-	-	40	50	10
16	-	-	40	60	-
17 y 18 ²⁻³	-	-	30	60	10
19	-	-	30	50	20
20	-	-	40	40	20
21	-	-	20	70	10
22 ³	-	-	30	60	10
23	-	-	30	50	20

Notas:

- 1- En todos los métodos se mantuvieron condiciones cromatográficas de 25 °C de temperatura de columna, 1,5 mL/min de flujo y las muestras fueron medidas a longitudes de onda de 210 nm.
- 2- Todos los métodos utilizaron como fase estacionaria una columna C18, dimensiones 4,6 mm x 100 mm con un tamaño de poro de 3,5 µm, a excepción del método 9, que utilizó una columna de sílica, dimensiones 4,6 x 150 mm con tamaño de poro de 5 µm.
- 3- Para el método 18 se empleó un detector de evaporativo de dispersión de la luz (ELSD por sus siglas en inglés), a diferencia del resto de métodos que utilizaron un detector de ultravioleta-visible DAD.
- 4- Los métodos 18 y 22 incluyen un gradiente de fase móvil que se describe en la Tabla 39. El resto de los métodos utilizaron una fase móvil isocrática.

Tabla 39: Descripción del gradiente aplicado para los métodos 18 y 22 para el desarrollo del método de evaluación de la composición de la nanopartícula lipídica

Tiempo (minutos)	Isopropanol	Acetonitrilo	Solución Tampón
0-25	30	60	10
25	30	60	10
28	70	30	0
38	70	30	0
42-50	30	60	10

Tabla 40: Tiempos de retención de los componentes lipídicos bajo las diferentes condiciones analíticas experimentadas

Método	Tiempos de retención (minutos) ¹⁻²						
	Chol-mPEG-mal	DSPE-mPEG-mal	DSPE-mal	Colesterol	Dlin-MC3-DMA	DSPE-mPEG2000	DSPC
1	-	-	-	7,5			
2	-	-	3,5	2,75 - 4,5			
3	-	-	-	-			
4	-	-	-	-			
5	2,1	2,5 - 5	4,6 - 5	8,3			
6	1	1,1	1,2	-			
7	1,2 - 1,85	1,5 - 1,85	1,2 - 2,15	4,25			
8	1,1 - 3	3,2 - 5 - & 15,7	13,5 - 15,5	17,5			
9	-	-	-	-			
10	0,4 - 0,9	0,4 - 0,9	0,4 - 0,9	-			
11	0,4	0,4	0,4	-			
12	-	-	-	7			
13	-	-	-	-			
14	0,6 - 1,6	3 - 4,4	2,4	-			
15	3,25	3 - 6,5	3,7 - 6,5	14			
16	1,5	0,6 - 0,65	-	4,75			
17	2,5 - 5,5	7 - 11,7	8 - 11	2,3			
18	6,889	9,684	9,7 - 11,4	21,684	30,569	11,184	-
19	11	-	0,75	-			
20	6	0,7 - 14	0,7	-			
21	11	19 - 21,3	17 - 21	-			
22	7,2	10,4	12,3	23,6	31,2	0,6 - 2,2	2,9 - 3,25
23	6,0 - 12,0	-	-	25	24	-	4,2

Notas:

- 1- Los espacios en blanco indican que los materiales correspondientes no fueron incluidos en esa prueba específica, mientras que los guiones indican que, aunque el material fue incluido en la prueba e inyectado en el HPLC, no fue posible detectar o discernir señal alguna.
- 2- Las celdas resaltadas en amarillo indican que los picos correspondientes a uno o varios materiales se solaparon dentro de una misma corrida analítica, mientras que las resaltadas en verde indican que se logró una detección y clara y resolución entre todos los picos considerados en esa corrida analítica. Ver cromatogramas en el Anexo 1, Figura A 8.

De acuerdo con los resultados observados en la Tabla 40, el método que mostró potencial para aplicarse a la identificación y cuantificación de los componentes lipídicos de la nanopartícula fue el método número 22.

Como se mencionó, para el análisis de los excipientes por separado se utilizaron soluciones etanólicas de cada material. En el caso de la evaluación de las nanopartículas, como los lípidos se encuentran dispersos en estado sólido, se requiere primero poder obtener una solución de estos. Para ello, se procedió a liofilizar una muestra de suspensión de nanopartículas para eliminar todos los solventes, y poder posteriormente disolver los lípidos de forma completa en etanol. Bajo estas condiciones, todos los componentes de las nanopartículas se detectaron excepto el DSPE-mPEG-2000. Debido al porcentaje que se emplea en la fórmula (1,5%), la concentración resultante con el método descrito anteriormente quedó por debajo del límite de detección. Esto, sin embargo, no constituye un inconveniente para la caracterización del resto de componentes, ni particularmente para el lípido funcional.

4.2.1.3 Análisis de la distribución de la maleimida para optimizar la selección del lípido funcional

La metodología desarrollada se aplicó para poder determinar, en un primer bloque experimental, la cantidad total de lípido maleimida después de la fabricación y la cantidad que permanece después de aplicar la diálisis con dos tampones distintos (PBS 1X y tampón de citrato con pH de 5,5, a una concentración de 5 mM). Inicialmente, se asume que la diferencia entre esas mediciones representa el material que no se incorporó a la nanopartícula, permaneciendo en el líquido sobrenadante. Esta evaluación se realizó siguiendo el diseño experimental descrito en la sección 3.3.1.1.3, y los resultados se presentan en la Figura 62.

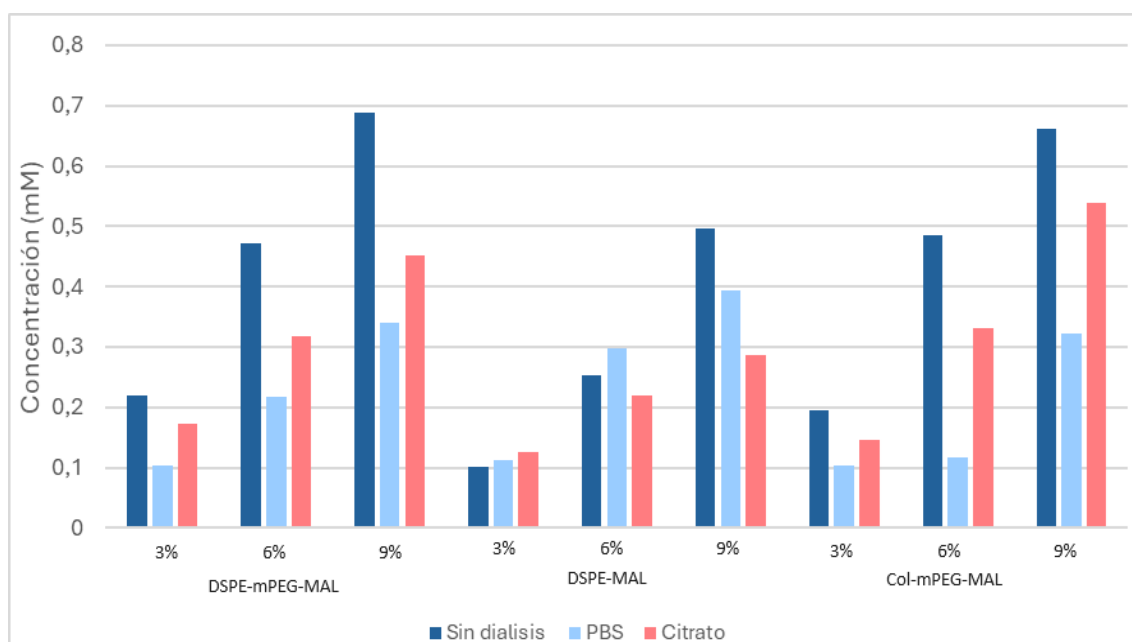


Figura 62: Cuantificación del lípido maleimida mediante HPLC-UV en nanopartículas con diferentes lípidos funcionales y condiciones de purificación

Se muestran los valores de lípido total (barras azules, sin diálisis) y tras la diálisis con PBS 1X (barras celestes, pH 7,4) o tampón de citrato (barras rojas, pH 5,5). La reducción en la cantidad de lípido funcional varía según la solución tampón. Un análisis de regresión de respuesta ($r^2=0,97$) arrojó diferencias significativas para el tipo de lípido (valor $p < 0,01$) el porcentaje de lípido y la diálisis aplicada (valor $p < 0,001$ para ambos factores, $N= 27$).

Durante el análisis de las muestras dializadas, se observó la aparición de un nuevo pico alrededor de los 3,8 minutos en las muestras dializadas con PBS 1X. Esto puede indicar que, además de la reducción por eliminación en la diálisis, puede haber una hidrólisis parcial del lípido funcional en el caso del PBS 1X (ver Anexo1, Figura A 9).

Si bien este bloque experimental permite cuantificar la maleimida remanente después de la diálisis, los valores obtenidos para las barras rojas (o celestes) de la Figura 62 podrían no reflejar únicamente la cantidad de maleimida disponible para funcionalización. Efectivamente, parte de la maleimida podría estar encapsulada dentro de la nanopartícula. Por lo tanto, fue necesario implementar una estrategia adicional para poder discernir entre la maleimida incorporada superficialmente y la que se encuentra en el interior.

Para lograrlo, se empleó el kit comercial fluorimétrico MAK 167 detallado en la sección 3.2.3.8 y el diseño experimental descrito en la sección 3.3.1.1.3. Esta prueba se realizó directamente en suspensiones no funcionalizadas de nanopartículas, permitiendo que el reactivo interactuara solo con la maleimida expuesta. Los resultados de esta evaluación específica se presentan en la Figura 63, mientras que la Figura 64 muestra una representación adicional del efecto del porcentaje de lípido agregado, significativo únicamente para nanopartículas fabricadas con DSPE-mPEG-MAL y el Colesterol-mPEG-MAL.

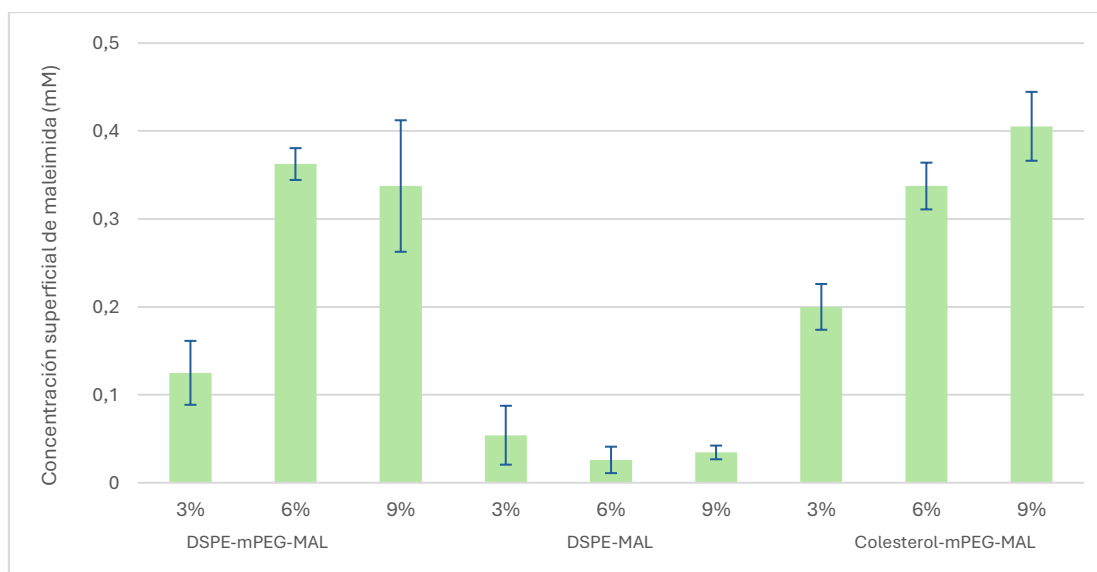


Figura 63: Disponibilidad superficial de maleimida en diferentes formulaciones de nanopartículas después de la diálisis con tampón de citrato 5 mM, pH 5,5.

La concentración superficial de maleimida muestra un incremento proporcional con el porcentaje agregado a la formulación de DSPE-mPEG-MAL y el Colesterol-mPEG-MAL, especialmente al 3 y 6% de lípido agregado. En contraste, el DSPE-MAL muestra una expresión general significativamente más baja y sin correlación con los niveles de concentración. El análisis de varianza señaló diferencias significativas para el tipo de lípido (valor $p < 0,05$) (N=27).

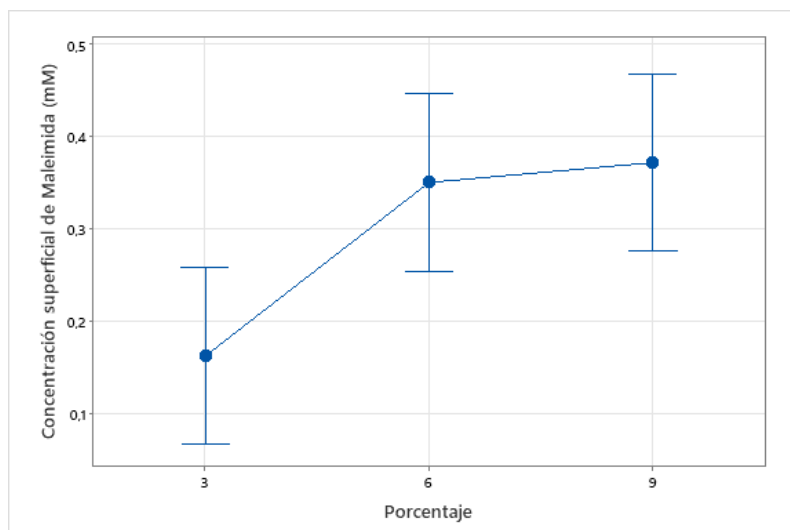


Figura 64: Tendencia de la concentración superficial de maleimida según el porcentaje de lípido ionizable para el DSPE-mPEG-MAL y el Colesterol-mPEG-MAL

Gráficas de intervalos de confianza proveniente del análisis de varianza. Se muestra que la diferencia de las medias de 6 y 9% comparadas con la de 3% posee significancia estadística (valor $p < 0,05$). La validez de esta observación se corrobora a través de la prueba de Tukey ($N=18$).

Un análisis integrado de los resultados presentados en la Figura 63 y la Figura 64, utilizando los valores de maleimida total, maleimida post-diálisis, y maleimida superficial, permitió calcular la cantidad de lípido que permaneció en el sobrenadante y la cantidad que queda en el interior de la nanopartícula. Este análisis permite trazar un mapa detallado de la distribución del lípido funcional dentro de la formulación tras el proceso de fabricación. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 65, representado la distribución en términos absolutos, mientras que en la Tabla 41 se muestra la distribución porcentual de esas cantidades, para cada una de las diferentes condiciones probadas.

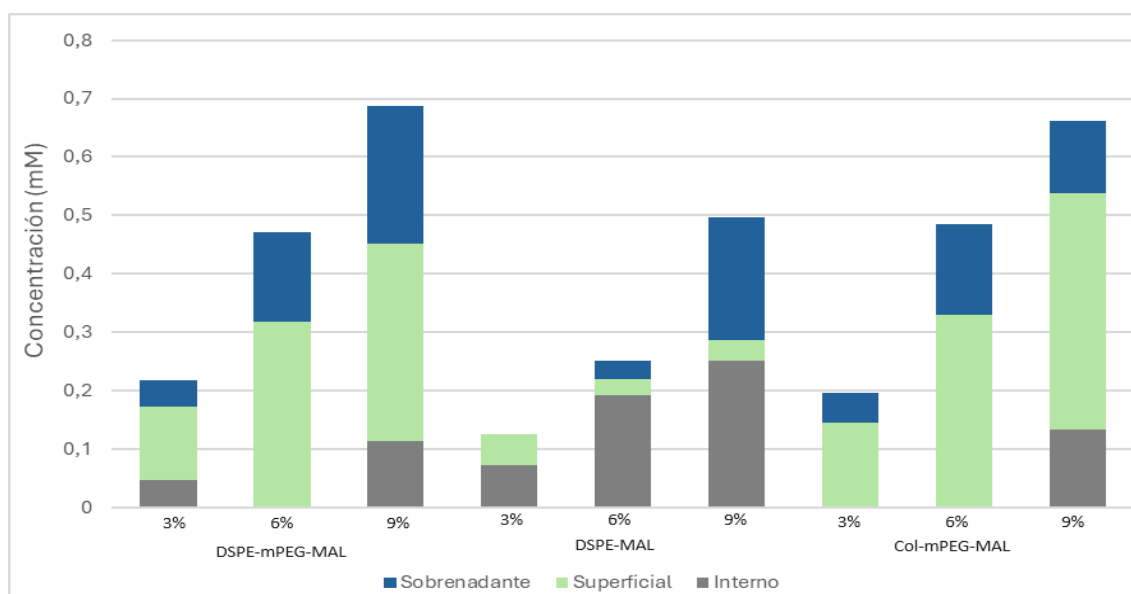


Figura 65: Distribución del lípido maleimida dentro de la formulación de nanopartículas según el tipo de lípido funcional y el porcentaje utilizado

Se muestran las concentraciones de maleimida según las siguientes fracciones definidas: la fracción sobrenadante (eliminada tras la diálisis), la fracción disponible superficialmente, y la fracción interna (diferencia entre la cantidad post-diálisis y la disponible superficialmente). Particularmente se observa una mayor cantidad en el interior de las nanopartículas fabricadas con DSPE-MAL, y mientras que muy poco o nada dentro de las nanopartículas fabricadas con DSPE-mPEG-MAL y el Colesterol-mPEG-MAL, especialmente al 3 y 6% de lípido agregado.

Tabla 41: Distribución porcentual de la maleimida dentro de la formulación de nanopartículas según el tipo de lípido funcional y el porcentaje utilizado

Lípido funcional	Porcentaje de lípido	Ubicación porcentual de la maleimida en la suspensión de nanopartículas		
		Superficial	Sobrenadante	Interno
DSPE-mPEG-Mal	3	57,08	21,46	21,46
	6	76,80	23,20	0,00
	9	49,06	34,30	16,64
DSPE-Mal	3	42,73	0,00	57,27
	6	10,31	12,90	76,80
	9	6,95	42,24	50,81
Colesterol-mPEG-Mal	3	74,49	25,51	0,00
	6	68,00	32,00	0,00
	9	61,24	18,66	20,10

Utilizando los datos de la Tabla 41, se llevó a cabo un análisis de regresión de superficie de respuesta, que proporcionó coeficientes de determinación (r^2) para las tres respuestas evaluadas (0,906 para el porcentaje de maleimida superficial; 0,900 para el sobrenadante y 0,898 para el porcentaje interno). Este análisis de regresión permite visualizar y evaluar de forma significativa las tendencias principales de estas respuestas para cada lípido, y entender posibles interacciones complejas entre las variables. Desde la Figura 66 hasta la Figura 71 se muestran las gráficas de efectos principales y gráficas de interacción obtenidas de este análisis de regresión.

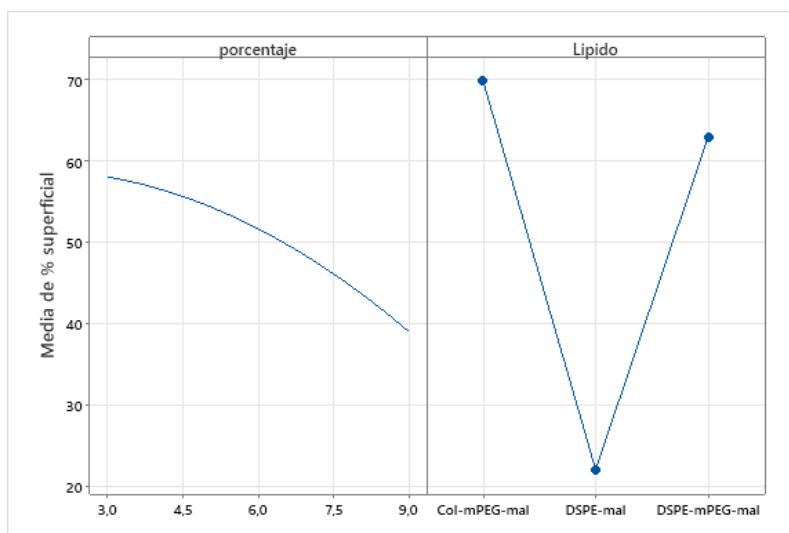


Figura 66: Gráfica de efectos principales del tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se ubica en la superficie de la nanopartícula

Los efectos principales por factor muestran que conforme aumenta el porcentaje de lípido funcional en la fase etanólica, menor cantidad de ese lípido se expresa en la superficie de la nanopartícula. De manera congruente con lo observado en la Figura 63 y la Figura 65, se observa que el DSPE-MAL es el tipo de lípido que presenta una menor proporción de maleimida en la superficie de la nanopartícula.

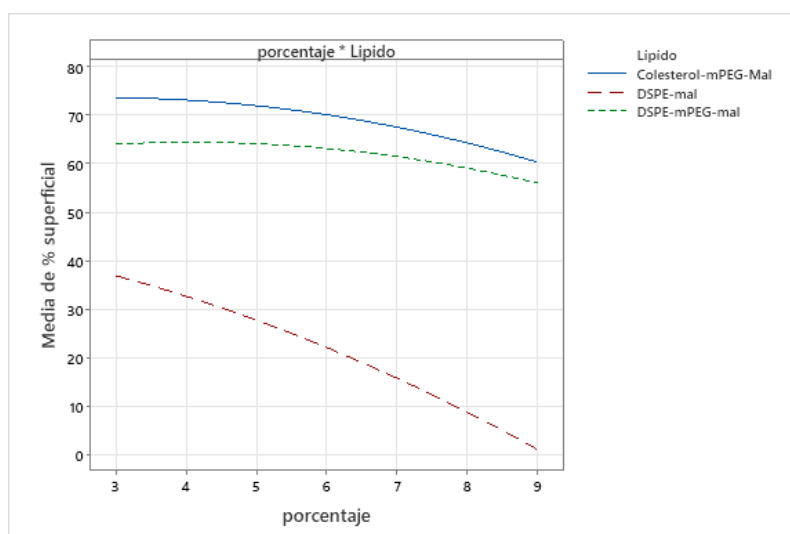


Figura 67: Gráfica de interacción entre el tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se ubica en la superficie de la nanopartícula

Se observa que el efecto de la cantidad de lípido sobre el porcentaje de maleimida superficial mantiene la misma tendencia para los tres lípidos probados, aunque la pendiente es mucho más pronunciada para el DSPE-Mal.

También muestra que existe mayor diferencia entre el DSPE-mPEG-MAL y el Colesterol-mPEG-MAL en los porcentajes más bajos.

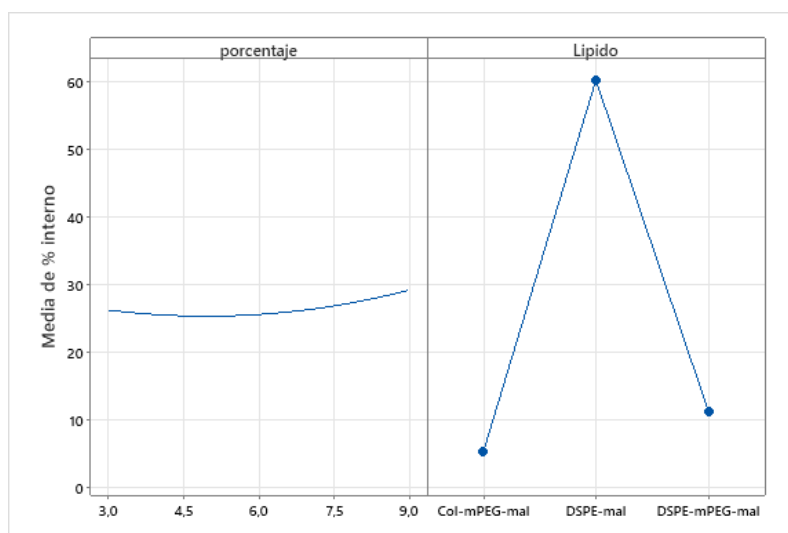


Figura 68: Gráfica de efectos principales del tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se ubica en el interior de la nanopartícula

La figura muestra que el porcentaje de la maleimida que se distribuye en el interior de la nanopartícula se mantiene relativamente constante en función de los diferentes porcentajes evaluados. Además, muestra que el lípido que se distribuye en mayor medida dentro de la nanopartícula es el DSPE-Mal.

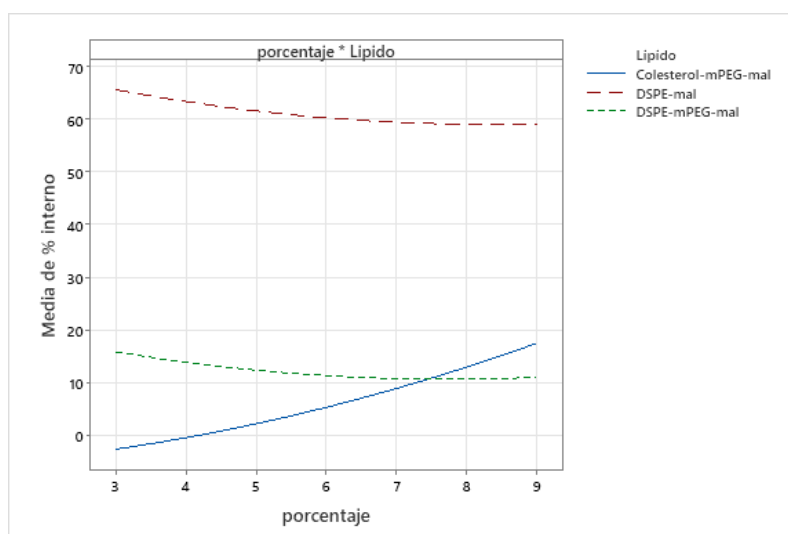


Figura 69: Gráfica de interacción entre el tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se ubica en el interior de la nanopartícula

La visualización del comportamiento por cada tipo de lípido muestra que para el DSPE-MAL y el DSPE-mPEG-MAL se observa una caída inicial en el porcentaje interno que se estabiliza cuando la cantidad de lípido agregada alcanza valores entre el 6 y el 7%. Por otra parte, en el caso del Colesterol-mPEG-MAL se observa una tendencia constante al aumentar el porcentaje interno de maleimida a lo largo de todos los porcentajes evaluados.

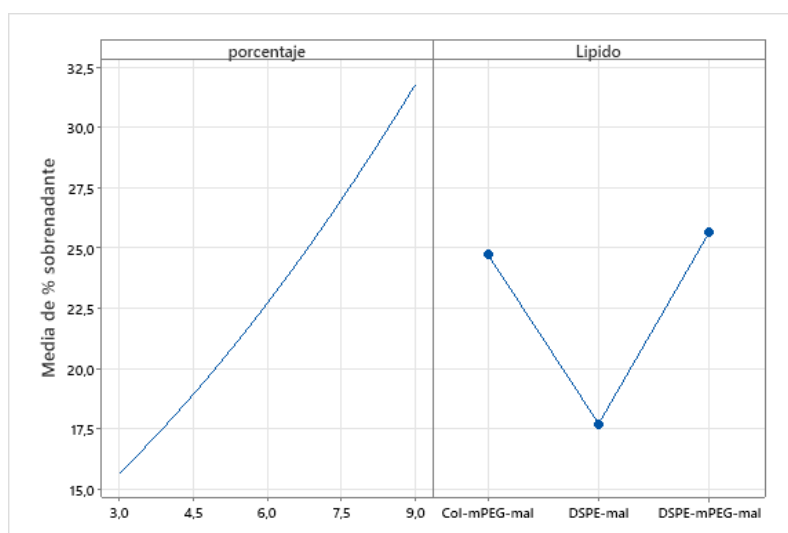


Figura 70: Gráfica de efectos principales del tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se queda en el líquido sobrenadante

En términos generales, conforme aumenta el porcentaje de lípido agregado a la fase lipídica, se observa una marcada tendencia a que también aumente el porcentaje de ese lípido que se queda en el líquido sobrenadante, no incorporándose a la nanopartícula misma. Los valores promedio más altos de porcentaje de maleimida en el sobrenadante se observan con el DSPE-mPEG-MAL y el Colesterol-mPEG-Mal.

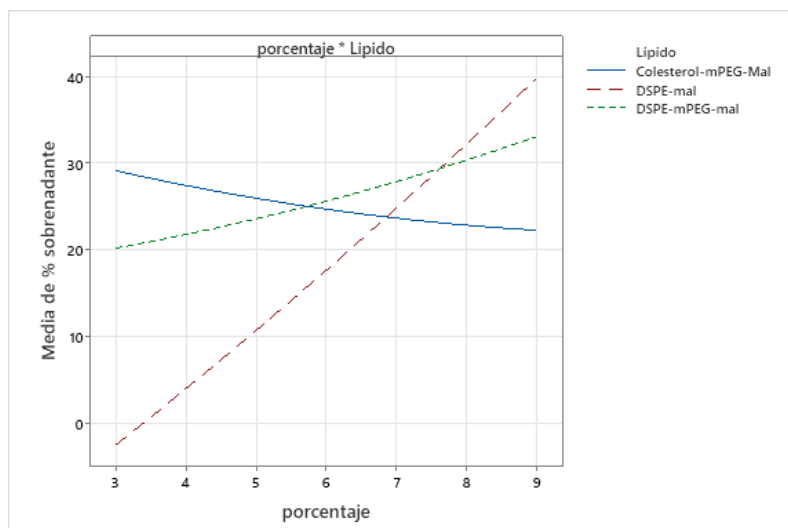


Figura 71: Gráfica de interacción entre el tipo de lípido y cantidad agregada sobre el porcentaje de la maleimida que se queda en el líquido sobrenadante

Aunque con el DSPE-Mal, en promedio, es menor el porcentaje de lípido funcional que se queda en el sobrenadante (ver Figura 70 a la izquierda), es el material en el que se ve una tendencia creciente más acentuada conforme aumenta su concentración en la formulación (lo que también se puede observar en la tendencia del grosor de las barras azul oscuro de la Figura 65). Por otra parte, los otros dos excipientes muestran una pendiente similar, pero inversa entre sí. En el DSPE-mPEG-MAL el porcentaje de sobrenadante tiende a aumentar de forma moderada con los aumentos en la concentración en la formulación, en el colesterol tiende a disminuir, siendo el material con menor porcentaje de maleimida remanente en el sobrenadante al 9% de lípido funcional en la fase lipídica.

Este diseño experimental que abarca tanto el desarrollo y aplicación de técnicas analíticas, como el manejo de la purificación de las muestras, permite avanzar en el entendimiento de la localización de la maleimida y ofrece una perspectiva de la dinámica de incorporación en las nanopartículas lipídicas en diferentes configuraciones de formulación. Especialmente muestra que tanto el Colesterol-mPEG-MAL como el DSPE-mPEG-MAL son los excipientes con una mayor expresión superficial de la maleimida, que posiblemente puede atribuirse a la presencia de las moléculas de PEG. Sin embargo, estos resultados sugieren que esta característica es “saturable”.

Efectivamente, los resultados de la progresión de las barras verdes de la Figura 65, y confirmados por la orientación de las líneas de la Figura 66 y la Figura 67 demuestran que conforme se aumenta el porcentaje de lípido maleimida agregado a la fórmula, menor es el porcentaje de ese lípido que se mantiene en la superficie de la nanopartícula. Ese decrecimiento en la expresión superficial ocurre a expensas del material encapsulado a lo interno, principalmente en el caso del Colesterol-mPEG-MAL, o del material que queda sin incorporar a la nanopartícula en el sobrenadante, principalmente en el caso del DSPE-mPEG-MAL. La acumulación de exceso en el sobrenadante también se observa en el caso del DSPE-MAL lo que sugiere que esa distribución podría estar influenciada por la estructura química del compuesto base: interna para el excipiente estructural (colesterol) y externa para el fosfolípido (lípido *HELPER*, DSPE).

De manera conjunta, los resultados de la subsección 4.2.1 apuntan a que tanto el DSPE-mPEG-MAL como el Colesterol-mPEG-MAL exhiben comportamientos comparables en términos de expresión superficial de maleimida, además de impactar de manera similar las principales propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas. Estos hallazgos justifican la preselección de estos dos excipientes para pruebas futuras, mientras que indican que el DSPE-MAL debe ser descartado debido a su distribución más favorable dentro de la partícula, y su impacto más heterogéneo en los atributos críticos de calidad del prototipo base. Esta preselección refuerza

la base de conocimiento necesaria para avanzar hacia la funcionalización con péptidos superficiales para el direccionamiento activo a través de la BHE.

4.2.2 Funcionalización con péptidos superficiales

Las variables del proceso de incorporación de péptidos que afectan la eficiencia de funcionalización (Ecuación 4) se evaluarán utilizando dos métodos analíticos complementarios. El primero de los métodos consiste en un método de cuantificación de aminoácidos para poder determinar exactamente la cantidad acoplada a las nanopartículas. Este método se basa en la hidrólisis y derivatización de los aminoácidos para su posterior detección mediante HPLC-UV (sección 3.2.3.9). El segundo método será el método HPLC-UV para la cuantificación de los componentes lipídicos cuyo desarrollo se describe en la sección 4.2.1.2. En esta aplicación, se observará específicamente la disminución del pico correspondiente a la maleimida en las diferentes condiciones de funcionalización, además de monitorizar la posible aparición de nuevos picos indicativos de la formación de complejos péptido-lípido.

De los dos lípidos maleimida preseleccionados en la sección anterior, se realizó una evaluación que sugirió un comportamiento comparable en términos de funcionalización para ambos excipientes (ver Anexo 1, Figura A 11). Por ese motivo, y con el fin de optimizar los recursos disponibles, se decidió realizar las primeras pruebas de funcionalización únicamente con DSPE-mPEG-MAL. Este excipiente fue seleccionado debido a su mayor adaptabilidad para monitorear la funcionalización mediante cuantificación del lípido con el método HPLC-UV, en comparación con lo observado para el Colesterol-mPEG-MAL (ver Anexo 1, Figura A 10). También por optimización de recursos, las primeras exploraciones se realizaron utilizando únicamente el péptido derivado de la glicoproteína del virus de la rabia (RVG), para luego extenderlo a los otros péptidos evaluados.

4.2.2.1 Efecto del medio de incubación

Para esta prueba se evaluó el efecto del pH sobre la eficiencia de funcionalización. Se utilizaron nanopartículas preparadas con 5 y 10% de DSPE-mPEG-MAL, ambas previamente dializadas. Las nanopartículas fueron funcionalizadas con un exceso 2:1 de péptido derivado de la glicoproteína del virus de la rabia (RVG) durante un período de dos horas, protegidas de la luz, en tres condiciones distintas de pH. Se utilizaron tampón de fosfatos con diferentes valores de pH, de 6,91, 7,4 y 8,13. Posteriormente se realizó una segunda diálisis con PBS 1X para eliminar el exceso de péptido. La eficiencia de funcionalización se calculó basándose en la cantidad de maleimida superficial previamente medida por análisis fluorimétrico, y la concentración de péptido de después de una segunda diálisis post-funcionalización (Ecuación 4) empleando la técnica de cuantificación de aminoácidos por hidrólisis y derivatización.

Los resultados, que se encuentran en la Figura 72, mostraron variaciones significativas en la eficiencia de funcionalización dependiente del pH utilizado. Aunque se probaron dos porcentajes distintos de lípido funcional (5 y 10% de lípido maleimida) los resultados no mostraron diferencias significativas ni en términos absolutos (el contenido total de péptido fue relativamente el mismo para los dos porcentajes probados), ni en términos de eficiencia de funcionalización (valor $p > 0,05$) lo que resulta congruente con las observaciones acerca de la localización de la maleimida de la sección 4.2.1.

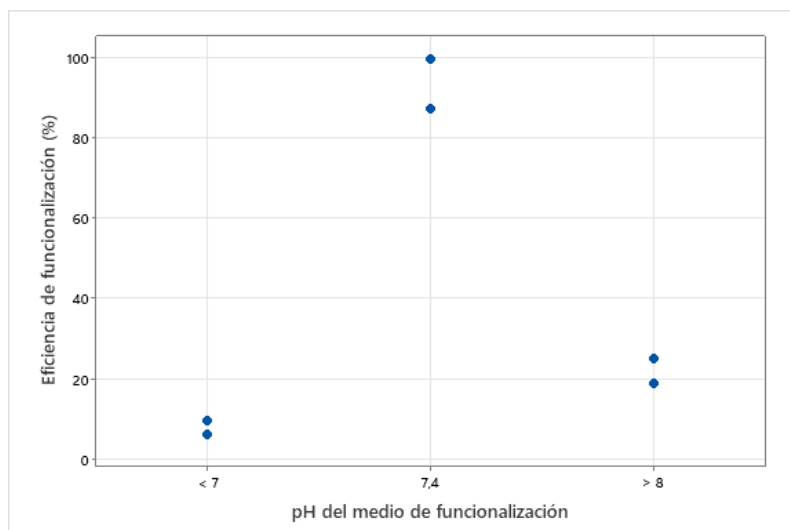


Figura 72: Efecto del pH del medio de incubación en la en la eficiencia de funcionalización

Mientras que los otros valores de pH no muestran eficiencias superiores al 30%, la mayor eficiencia de funcionalización se observa al pH de 7,4 de forma estadísticamente significativa (valor $p < 0,01$). Análisis post-hoc con la prueba de Tukey confirma diferencia entre la media del medio con pH de 7,4 y los otros dos medios ($N=6$).

4.2.2.2 Efecto del tiempo de incubación y la proporción maleimida/péptido

Para evaluar la influencia de la proporción maleimida/péptido y el tiempo de incubación se utilizaron 3 distintas proporciones de maleimida/péptido (1:1, 1:1,25 y 1:1,5) y distintos tiempos de incubación (20, 40 y 60 minutos), protegidas de la luz. El seguimiento de la reacción se realizó a partir de la reducción en la cuantificación de maleimida por HPLC-UV, y el seguimiento del pico inespecífico que aparece a los 29 minutos cuando la maleimida reacciona con el péptido (ver Anexo 1, Figura A 10).

Antes de la incubación con el péptido, las muestras de nanopartículas con 6% de DSPE-mPEG-MAL fueron dializadas, y la maleimida superficial disponible fue cuantificada según el método fluorimétrico previamente descrito para determinar la cantidad de péptido a agregar según la proporción a evaluar. Después de la reacción de funcionalización, y antes de la evaluación por HPLC, las nanopartículas se sometieron a una segunda diálisis para eliminar el exceso de péptido. Los resultados de esta prueba se presentan en la Tabla 42.

Tabla 42: Seguimiento por HPLC-UV de la reacción de funcionalización bajo distintas condiciones

Proporción maleimida/péptido		Área de referencia (mUA x s)		
		20 minutos	40 minutos	60 minutos
1 a 1	Maleimida	0	0	0
	Pico secundario	100,29	No detectado	101,24
1 a 1,25	Maleimida	176,64 (4,86% ¹)	33,92 (0,93% ¹)	0
	Pico secundario	99,55	103,46	115,87
1 a 1,5	Maleimida	0	0	0
	Pico secundario	101,0375	104,66	110,43

Notas:

- 1- Porcentajes de maleimida remanente que implican una reacción del 95,14% (resaltado en color naranja) y 99,07% (resaltado en color amarillo), calculados a partir del área de la muestra sin funcionalizar (3631,16). Las celdas de color verde destacan condiciones en las que se alcanzó una reducción del pico de maleimida del 100%.

4.2.2.2.1 Estudio en nanopartículas no dializadas

También se estudió el efecto de la proporción de maleimida a péptido en nanopartículas fabricadas con un 6 % de DSPE-mPEG-MAL pero, a diferencia de los resultados de la Tabla 42, estas nanopartículas no fueron sometidas a diálisis previa. Se utilizó un tiempo de funcionalización de 40 minutos, ya que fue el que mostró porcentajes de reducción de maleimida superiores a 99% en todas las condiciones reportadas en la Tabla 42. En este experimento adicional se emplearon tres proporciones distintas de maleimida/péptido (1:0,5 1:1 y 1:1,5) y la funcionalización se realizó protegiendo al medio de la luz.

Estas proporciones fueron calculadas sobre una base de maleimida que incluía la superficial más la sobrenadante, al no haberse realizado esa primera purificación. Es decir, la proporción 1:1 en estas condiciones de “no diálisis previa”, representa una cantidad superior a la proporción 1:1 cuando esta se calcula a partir de la disponibilidad de maleimida después de la diálisis. Posterior a la funcionalización se ejecutó una diálisis final con PBS 1X para eliminar el exceso de péptido, cualquier exceso de maleimida sobrenadante y los complejos con el péptido y la maleimida sobrenadante. Al determinarse la cantidad de maleimida sin reaccionar en la nanopartícula, se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 73.

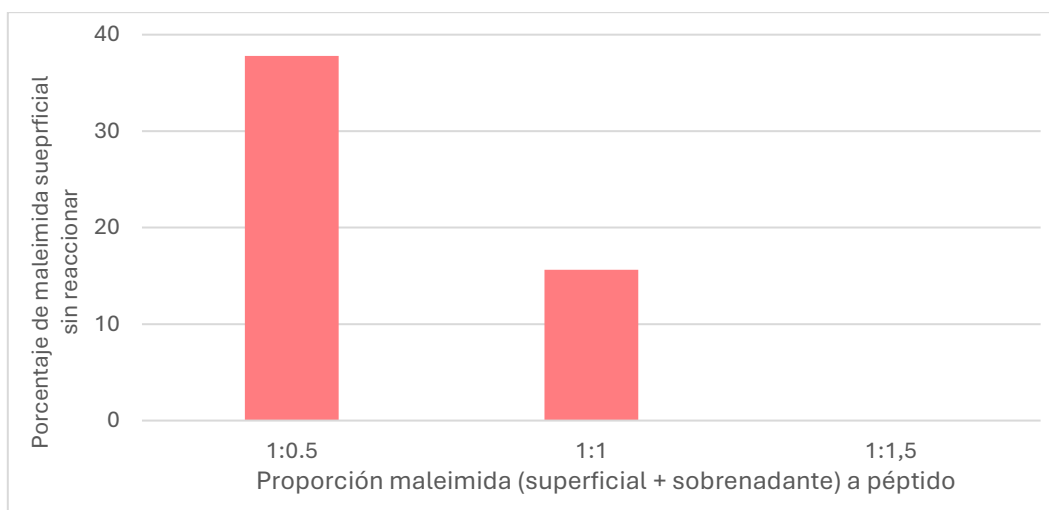


Figura 73: Maleimida remanente sin reaccionar después de la incubación de nanopartículas sin diálisis con distintas proporciones de péptido

La cantidad de maleimida considerada para calcular la proporción de péptido incluyó también la maleimida sobrenadante, mientras que el porcentaje de maleimida sin reaccionar se calcula a partir de la maleimida superficial (teórica). En condiciones donde existe maleimida libre en el sobrenadante, una proporción 1 a 1 de péptido maleimida es insuficiente para funcionalizar toda la maleimida en la superficie de la nanopartícula. Los valores absolutos obtenidos corresponden a 0,0638 y 0,0264 mM de maleimida.

Los resultados de esta sección, tanto los obtenidos en nanopartículas previamente dializadas como en aquellas donde se omitió esta primera funcionalización, indican que, en un tiempo de incubación de 40 minutos, una proporción 1:1 entre el lípido maleimida y el péptido es suficiente para reaccionar con los grupos maleimida disponibles para funcionalización. Por otra parte, cuando la funcionalización se realiza sin esa purificación inicial, es necesario aumentar la proporción maleimida a péptido a 1:1,5.

Aunque el escenario de omitir la primera diálisis puede parecer una ventaja al reducir el tiempo de proceso, este enfoque resulta en un consumo considerablemente superior de péptido. Este consumo superior es debido tanto al incremento en la base teórica de maleimida (que incluye

el sobrenadante además del superficial) como a la necesidad de aumentar la proporción maleimida:péptido, y puede representar hasta 2 veces más de péptido consumido. Por lo tanto, la selección entre estas dos estrategias distintas debe considerar tanto la eficiencia en tiempo de proceso como el costo asociado al uso del péptido.

4.2.2.3 Comparativa de la eficiencia de funcionalización empleando otros péptidos

Los estudios de funcionalización abordados hasta este momento emplearon únicamente el péptido RVG, por economía de recursos. Sin embargo, de igual manera como se hizo con el lípido maleimida en la sección anterior, se realizó también una evaluación comparativa para determinar si los resultados de eficiencia de funcionalización obtenidos con RVG podrían ser extrapolables a otros péptidos de direccionamiento a través de la BHE. Por lo tanto, se amplió la investigación para el efecto para incluir dos péptidos más: la versión retro-enantio de un péptido de direccionamiento al receptor de transferrina (THRre) (465,466) y el péptido Angiopep2, un péptido de direccionamiento a la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) (463). Estos péptidos fueron empleados para funcionalizar nanopartículas que contenían un 6% de DSPE-mPEG-Mal y dializadas previo a la funcionalización. Las nanopartículas fueron incubadas con el péptido a un pH de 7,4 durante 40 minutos protegidas de la luz, con un exceso de péptido de 1:1,25 respecto a su maleimida superficial. Los resultados de esta prueba se muestran en la Figura 74.

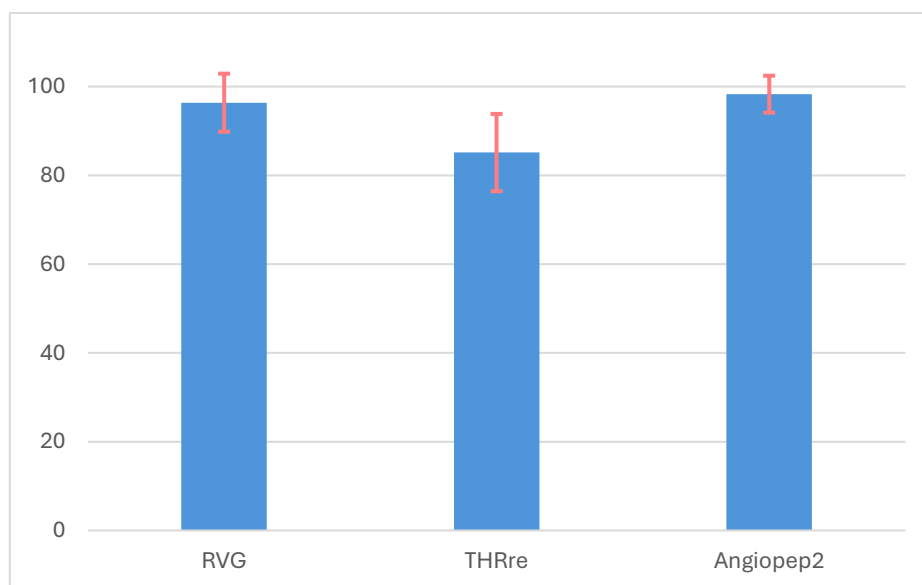


Figura 74: Eficiencia de funcionalización con los péptidos RVG, THRre y Angiopep2

La eficiencia de funcionalización, calculada por el contenido de péptido, no mostró diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el análisis de varianza ejecutado (valor $p < 0,05$, $N=6$).

Estos resultados indican que las propiedades de funcionalización observadas con el péptido RVG podrían ser extrapolables a los otros péptidos empleados como funcionalización para facilitar el paso por la BHE. Estos resultados validan la utilización de únicamente RVG en las etapas de pruebas de funcionalización, y la ampliación a otros péptidos en etapas de evaluación del desempeño.

4.2.3 Definición del protocolo de funcionalización

El protocolo de funcionalización se establece a partir de las principales observaciones de la sección 4.2.2, en las que se evaluaron diferentes condiciones de preparación y funcionalización de nanopartículas siguiendo el enfoque de QbD. En esta etapa se abordaron los parámetros

críticos señalados en el análisis de riesgo de la fase de preformulación, abordando sus implicaciones en los atributos de calidad relevantes. Aunque las evaluaciones de esta sección no incluyen evaluaciones de los atributos de naturaleza biológica, como la capacidad de transfección o la permeabilidad hacia cerebro, la eficiencia de funcionalización se empleó como criterio indirecto para optimizar las condiciones de funcionalización, dejando la evaluación de eficacia biológica para etapas siguientes del proyecto. Los detalles de las condiciones de funcionalización establecidas se presentan en la Tabla 43.

Tabla 43. Condiciones de funcionalización de las nanopartículas lipídicas

Parámetros de la formulación y del proceso de funcionalización	Configuración establecida
Composición de la nanopartícula	DLin-MC3-DMA, 40% DSPC, 10% DSPE-mPEG-2000, 1,5% DSPE-mPEG-2000-MAL o Colesterol -mPEG-MAL, 6% Colesterol, c.s.p
Requerimiento de diálisis pre-funcionalización	Si ¹
Cantidad de maleimida superficial	Calcular en cada lote de fabricación (método fluorimétrico) o asumir un valor correspondiente al $67,5 \pm 8,42\%$ del total de lípido maleimida agregado, según diluciones correspondientes.
Proporción maleimida:péptido	1:1,25
Medio de funcionalización	PBS 1X, pH 7,4
Tiempo de funcionalización	40 minutos
Otras condiciones	Muestras protegidas de la luz, bajo agitación constante
Diálisis final	PBS 1X

Notas:

- 1- En caso de que se omita esta parte, se deben ajustar las cantidades teóricas de maleimida y la proporción de maleimida:péptido según lo indicado en la sección 4.2.2.2.1.

4.2.4 Efecto de la funcionalización en el tamaño de partícula, PDI y el potencial zeta

Esta sección ilustra el efecto que la funcionalización tiene sobre el tamaño de partícula, PDI y el potencial zeta de las nanopartículas diseñadas, con el objetivo de identificar desviaciones respecto a los atributos seleccionados en el prototipo base. Además de los péptidos ya probados en las secciones anteriores, se prueba también el efecto de un cuarto péptido de direccionamiento: el MiniAp-4. Un péptido derivado del veneno de la abeja que ha mostrado capacidad de facilitar el tránsito a través de la BHE (473). Además, se agrega un control negativo que corresponde a nanopartículas incubadas con un exceso de cisteína para bloquear la maleimida libre. Los resultados de estas observaciones se resumen en de la Figura 75 a la Figura 80.

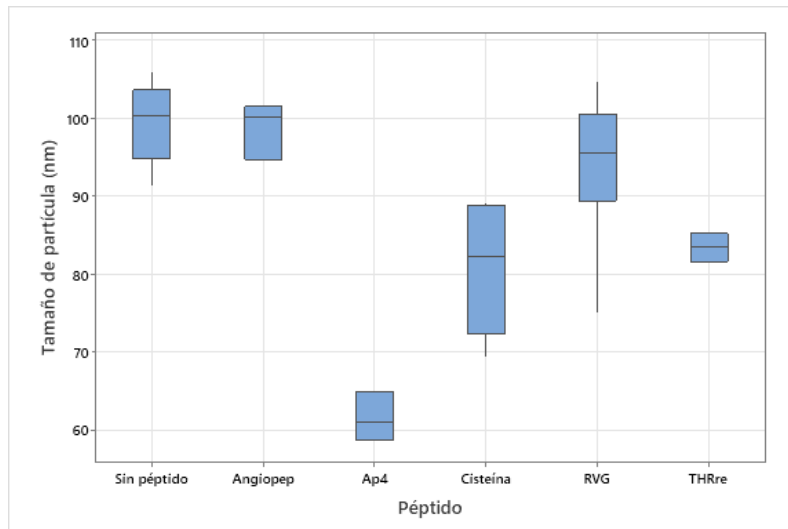


Figura 75: Impacto de la incorporación de diferentes péptidos en el tamaño de partícula.

A excepción del Angiopep2 y RVG, todas las demás funcionalizaciones muestran una reducción del tamaño de partícula observado, con una reducción más notable para el caso del Mini-Ap4. El análisis de varianza señala que existen diferencias significativas para los datos de al menos uno de los péptidos (valor $p < 0,001$). La Figura 76 y la Figura A 12 del Anexo 1 muestran información adicional sobre la comparación entre grupos.

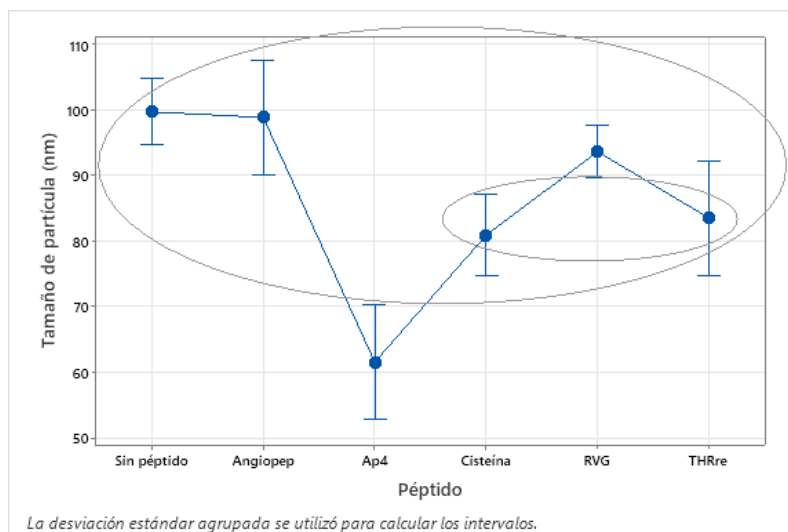


Figura 76: Gráficas de intervalo de confianza del análisis de varianza del tamaño de partícula con diferentes péptidos.

Las elipses señalan las agrupaciones según los resultados de la prueba post-hoc de Tukey. Se observa que las nanopartículas funcionalizadas con el péptido Mini-Ap4 difieren significativamente del resto de muestras. Adicionalmente, se observa un subgrupo adicional conformado por las muestras con cisteína y THRre (Figura A 12 del Anexo 1 presenta visualización adicional de las comparaciones de los intervalos de confianza simultáneos de Tukey).

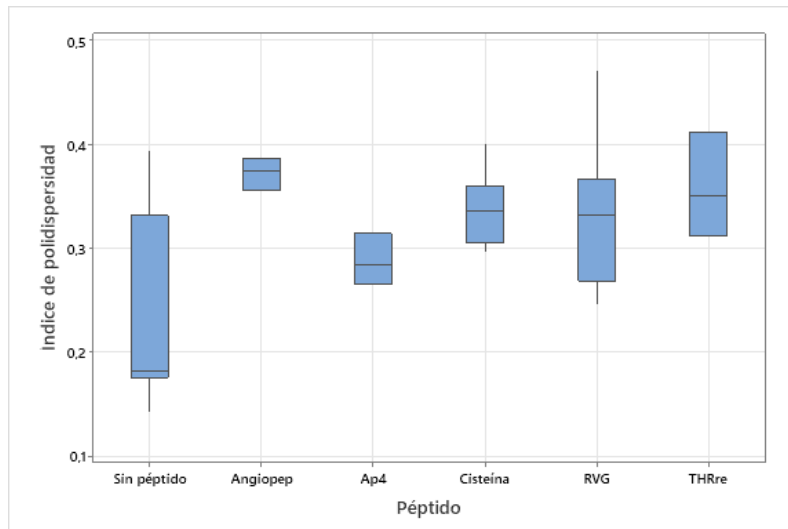


Figura 77: Impacto de la incorporación de diferentes péptidos en el PDI.

La funcionalización con cada uno de los péptidos representó un aumento significativo en el PDI comparado con las muestras sin péptido (valor $p < 0,01$). A excepción de la funcionalización con RVG, los datos recolectados para todos los otros péptidos muestran menor variabilidad comparados con la muestra sin péptido y el mismo RVG. La Figura 78 y la Figura A 13 del Anexo 1 muestran información adicional sobre la comparación entre grupos.

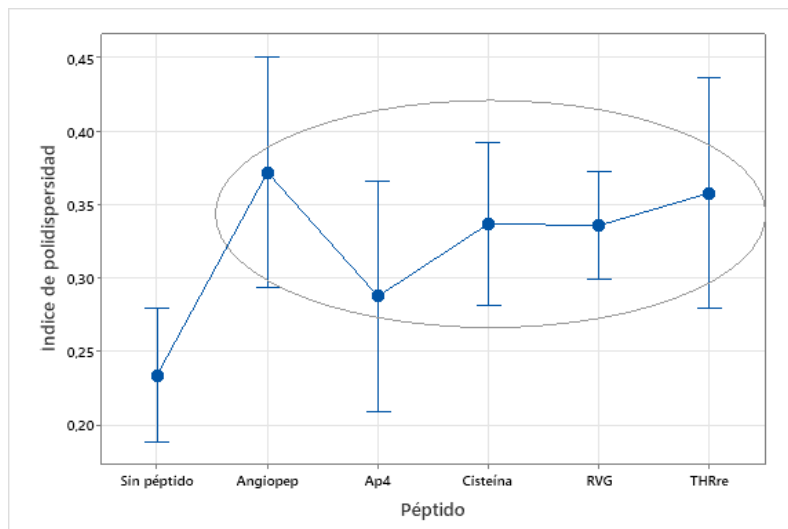


Figura 78: Gráficas de intervalo de confianza del análisis de varianza del PDI con diferentes péptidos.

El análisis post-hoc con la prueba de Tukey señaló que no hay diferencias estadísticamente significativas en el PDI entre los diferentes péptidos. Cada uno de esos péptidos muestra una diferencia significativa comparados con las muestras in funcionalizar (La Figura A 13 del Anexo 1 presenta visualización adicional de las comparaciones de los intervalos de confianza simultáneos de Tukey).

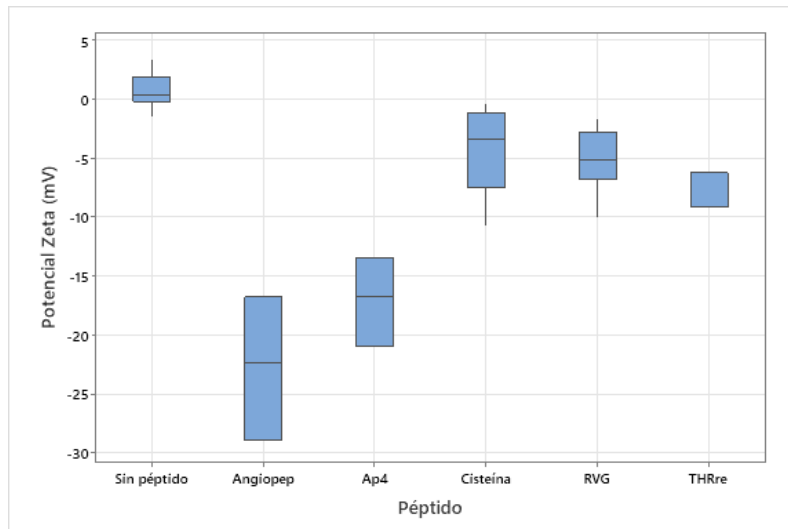


Figura 79: Impacto de la incorporación de diferentes péptidos en el potencial zeta.

La funcionalización con cada uno de los péptidos representó una reducción en el potencial zeta. Esta reducción es particularmente más pronunciada en el caso del Angiopep2 y el MiniAp-4. El análisis de varianza indicó la presencia de diferencias significativas entre las medias (valor $p < 0,001$). La Figura 80 y la Figura A 14 del Anexo 1 muestran información adicional sobre la comparación entre grupos.

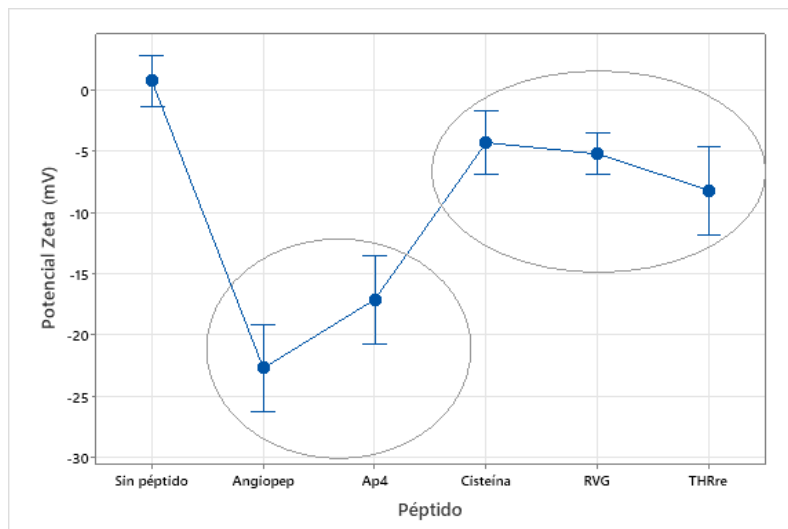


Figura 80: Gráficas de intervalo de confianza del análisis de varianza del potencial zeta con diferentes péptidos.

Las elipses señalan las agrupaciones según los resultados de la prueba post-hoc de Tukey, donde se observan tres grupos distintos con diferencias significativas entre sí. El primer grupo lo conforman el péptido Mini-Ap4 y Angiopep2, mostrando potenciales zeta con valores más negativos (medias entre -17,1 y -22,70). El segundo grupo está compuesto por la cisteína, el RVG y el THRre, mostrando medias entre -4,3 y -8,19). Estos grupos difieren significativamente entre sí, y con las nanopartículas sin funcionalizar. (La Figura A 14 del Anexo 1 presenta visualización adicional de las comparaciones de los intervalos de confianza simultáneos de Tukey).

Los resultados ilustrados en la Figura 76, Figura 77 y la Figura A 12 (Anexo 1), analizados a través de la prueba de Tukey, evidencian que la funcionalización con MiniAp-4, THRre y el bloqueo de maleimida con cisteína inducen una notable reducción en el tamaño de las nanopartículas, siendo más acentuada con el MiniAp-4. A partir de los datos en la Figura 79 y la evidencia adicional de la Figura 80 y la Figura A 14 (Anexo 1), se puede hipotetizar que esta reducción en tamaño podría estar asociada a un incremento en la repulsión entre las nanopartículas, manifestado por valores más negativos del potencial zeta (excepto en el caso de Angiopep2, donde esta correlación no se observa). Esto sugiere, una vez más, una interdependencia entre los CQA de las nanopartículas.

Por otra parte, la Figura 77 y la Figura 78 muestran que, aunque cada péptido (y el bloqueo con maleimida) incrementa el PDI en comparación con las nanopartículas sin funcionalizar, los valores absolutos de PDI no son significativamente diferentes entre péptidos. Sin embargo, es crucial destacar que el PDI, que se calcula como la razón entre la desviación estándar y el promedio del tamaño de partícula, puede aumentar simplemente debido a una reducción del tamaño promedio, sin que necesariamente indique un aumento en la variabilidad del tamaño. Como ya se discutió en el artículo: *"Dialysis is a key factor modulating interactions between critical process parameters during the microfluidic preparation of lipid nanoparticles"*, al ser un parámetro de dispersión relativa su interpretación podría no ser tan intuitiva como en el caso del tamaño y del potencial zeta (128). Para los casos particulares analizados desde la Figura 75 a la Figura 78 observamos que, bajo esta perspectiva de dispersión relativa, el Angiopep 2 muestra un aumento de PDI, aunque su tamaño promedio no difiere significativamente con el de las nanopartículas sin funcionalizar. Por lo tanto, este caso sugiere una mayor variabilidad en el tamaño afectando la homogeneidad propiamente sin el efecto del cambio en el tamaño promedio. En contraste, el MiniAp-4 muestra tanto el menor tamaño promedio, como el menor PDI de entre los péptidos evaluados, indicando que la funcionalización con este péptido implicó una mayor homogeneidad entre la población de nanopartículas.

Los resultados de esta subsección demuestran cómo las modificaciones superficiales de las nanopartículas mediante la adición de péptidos pueden influir en características clave como el tamaño de partícula, el potencial zeta y el PDI, y que estos efectos varían según el péptido específico.

En conjunto, la sección 4.2 mostró cómo el prototipo inicial desarrollado puede ser ajustado para incorporar estructuras moleculares específicas necesarias para su funcionalización, facilitando la interacción de las nanopartículas con la BHE. Cada modificación explorada ofrece nuevas posibilidades para optimizar las configuraciones en busca de cumplir con los parámetros de calidad del producto (QTPP) y ampliar el conocimiento sobre el proceso. El cumplimiento de estos objetivos de formulación establece un sólido punto de partida para avanzar hacia la realización de evaluaciones preliminares de desempeño biológico. Estas evaluaciones son cruciales para validar el potencial de las nanopartículas funcionalizadas en la administración dirigida de fármacos al SNC, lo cual será explorado en la próxima sección de esta investigación.

4.3 Evaluación del desempeño biológico de las nanopartículas lipídicas

En los apartados anteriores se estableció un prototipo base de nanopartículas lipídicas y se optimizó su proceso de funcionalización, con la posibilidad de acoplar diferentes péptidos con el objetivo de promover su direccionamiento activo a través de la BHE. Este proceso, guiado por los principios de QbD, exploró el espacio del diseño permitiendo una comprensión del impacto de cada una de las condiciones evaluadas en las características claves de la nanopartícula.

Complementando este desarrollo, la presente sección aborda la evaluación del desempeño biológico de esta formulación. De esta manera se complementan los atributos críticos de calidad con interacciones de alto riesgo señalados en la sección 4.1.1.2, asegurando su efectividad y biocompatibilidad. Esta etapa de evaluación es esencial para demostrar el potencial de esta formulación para el desarrollo de aplicaciones terapéuticas específicas dirigidas al SNC.

4.3.1 Reformulación del prototipo para agregar lípido fluorescente

La mayoría de las metodologías aplicadas en la sección de evaluación del desempeño biológico requieren detectar las nanopartículas mediante técnicas de fluorescencia. Sin embargo, el prototipo desarrollado en las secciones anteriores no posee ningún fluoróforo. Inicialmente se experimentó agregando Nile red a la solución lipídica. Sin embargo, las pruebas iniciales en modelos *in vitro* de permeabilidad a través de la BHE mostraron una reducción de la fluorescencia de las nanopartículas luego de atravesar la capa de células, probablemente por migración parcial del Nile red desde la nanopartícula hacia las membranas celulares.

Por ello se decidió reformular la nanopartícula para su uso en métodos de barrera y ensayos con animales, agregando el excipiente DSPE-mPEG-Cy5 (en un 1,5%) que posee el fluoróforo Cy5 unido de forma covalente. La comparación de los valores de tamaño de partícula, PDI y potencial zeta entre dos lotes preparados en serie, uno con y otro sin el lípido fluorescente. Los resultados que se presentan de la Figura 81 a la Figura 83 demuestran que no existen cambios significativos con esta modificación, y por lo tanto se continuó con las evaluaciones de desempeño biológico de la formulación.

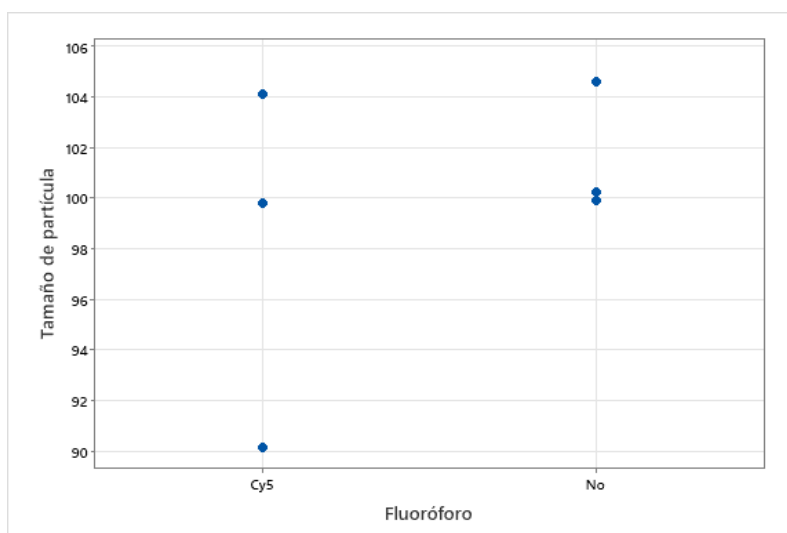


Figura 81: Impacto de la incorporación de lípido fluorescente en el tamaño de partícula.

De acuerdo con el análisis de varianza, la incorporación del lípido DSPE-mPEG-Cy5 en un 1,5% no genera diferencias estadísticamente significativas (valor $p > 0,05$).

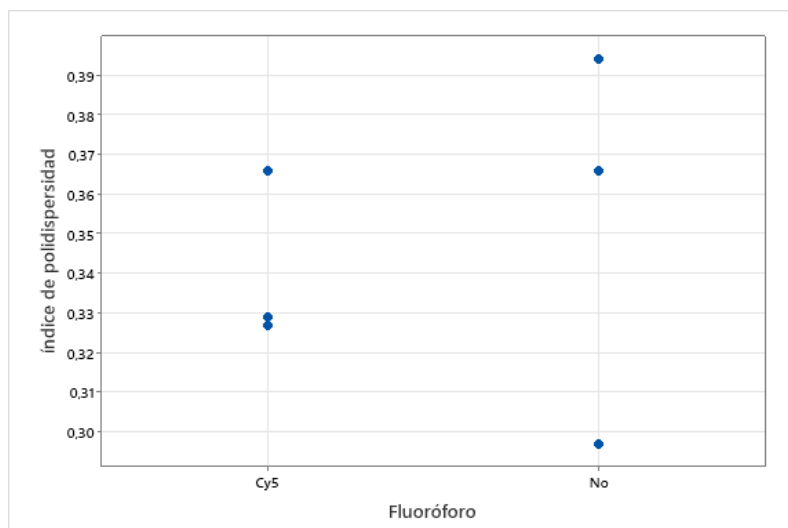


Figura 82: Impacto de la incorporación de lípido fluorescente en el PDI.

De acuerdo con el análisis de varianza, las diferencias observadas en el PDI tras la incorporación del lípido DSPE-mPEG-Cy5 en un 1,5% no son estadísticamente significativas (valor $p > 0,05$).

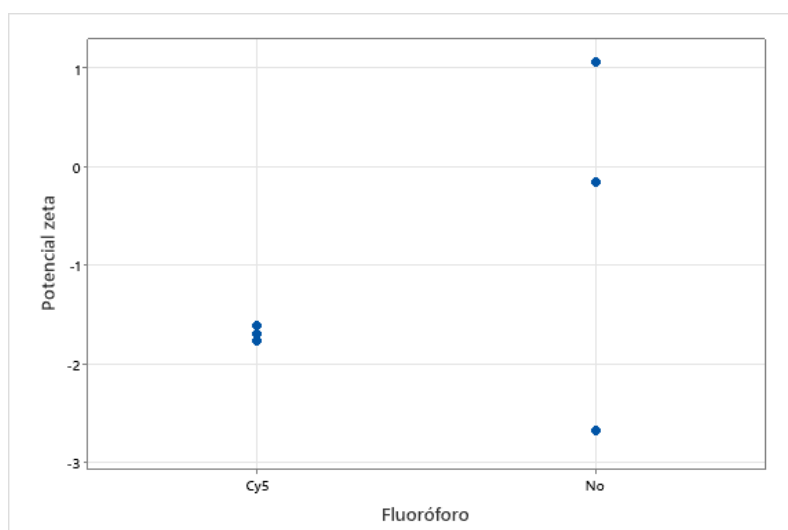


Figura 83: Impacto de la incorporación de lípido fluorescente en el potencial zeta.

De acuerdo con el análisis de varianza, las diferencias observadas en el potencial zeta tras la incorporación del lípido DSPE-mPEG-Cy5 en un 1,5% no son estadísticamente significativas (valor $p > 0,05$).

4.3.2 Evaluación de la viabilidad celular

La evaluación del atributo crítico de ausencia de citotoxicidad se evaluó mediante el cultivo de células HEK 293T con diferentes volúmenes de suspensión de nanopartículas durante 24 horas en condiciones de incubación controladas, a 37 °C. Posteriormente se realizó una evaluación visual para identificar cambios morfológicos o signos de muerte celular.

En esta evaluación se emplearon dos diferentes concentraciones de nanopartículas de partida. La primera serie de pruebas se realizó con diferentes volúmenes (entre 0 y 300 μL) de una suspensión de nanopartículas que contenía aproximadamente $(4,03 \pm 0,47) \times 10^{11}$ nanopartículas por mililitro, equivalente a una concentración de aproximadamente 4 mM en términos de lípidos totales. En la segunda repetición, se utilizó una suspensión con una concentración reducida de $5,04 \pm 0,05 \times 10^{10}$ nanopartículas por mL, con una concentración de lípidos totales de aproximadamente 0,5 mM. Los resultados de estas evaluaciones se presentan en la Figura 84 y la Figura 85, respectivamente.

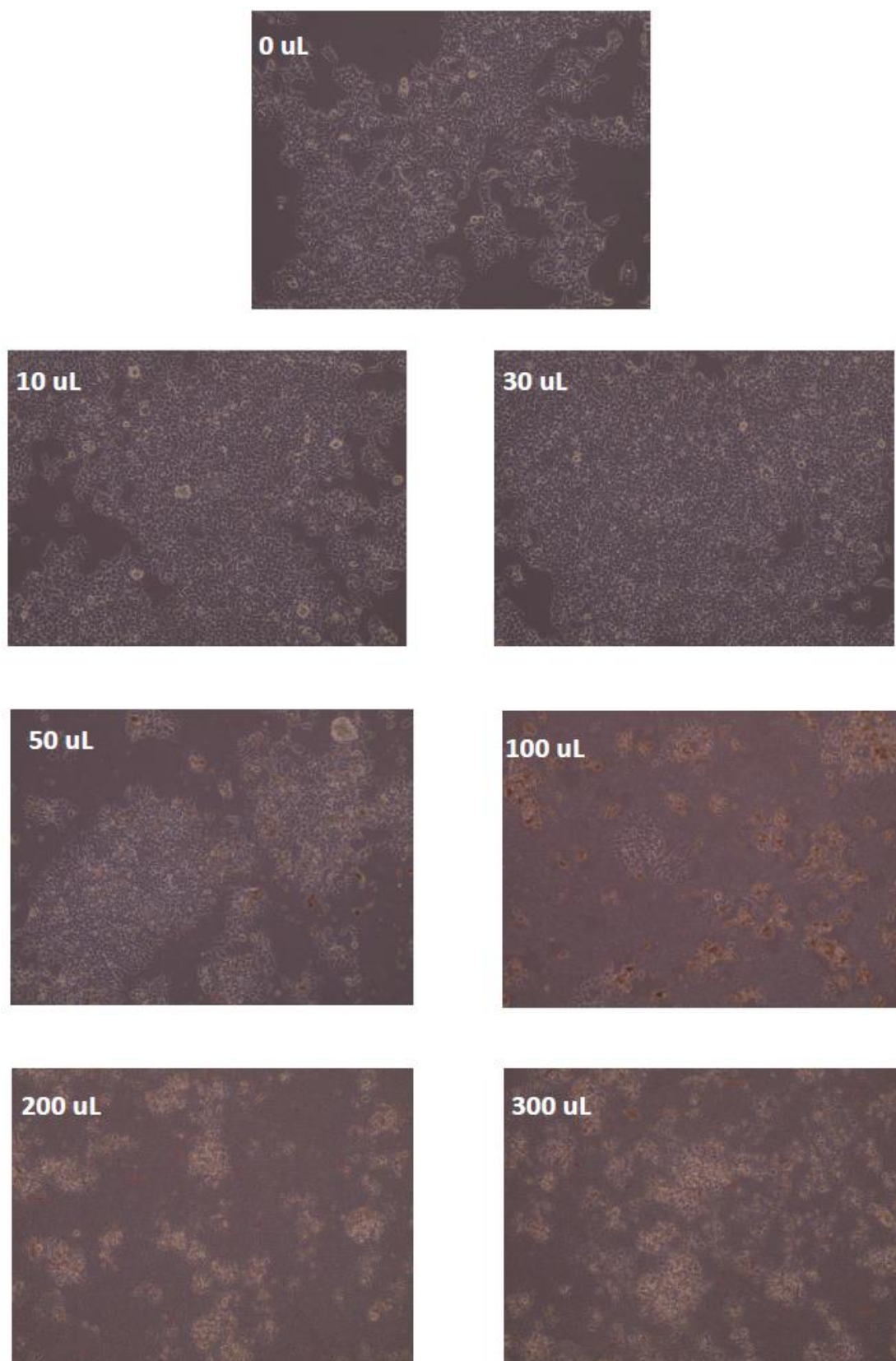


Figura 84: Evaluación de la viabilidad celular en células HEK 293T expuestas a volúmenes de una suspensión de nanopartículas lipídicas con $4,03 \times 10^{11}$ nanopartículas por mililitro.

Se muestra el efecto de los incrementos de los volúmenes de suspensión de nanopartículas desde 0 hasta 300 μL . Las células mantienen su morfología hasta el umbral de los 30 μL , observándose alteraciones a partir de los 50 μL y con un claro decrecimiento de la densidad celular a partir de los 100 μL , indicando efecto citotóxico para estas concentraciones.

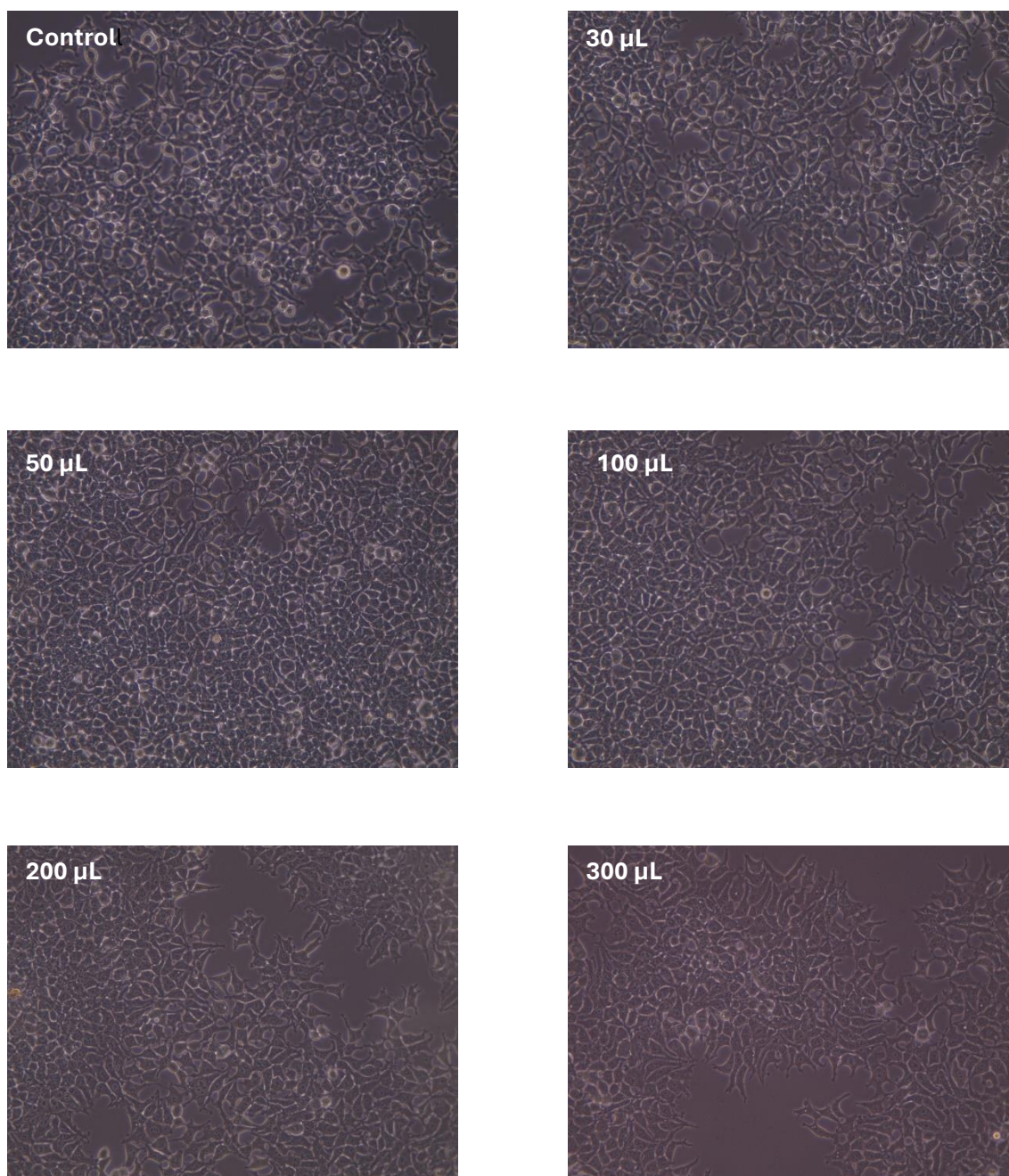


Figura 85: Evaluación de la viabilidad celular en células HEK 293T expuestas a volúmenes de una suspensión de nanopartículas lipídicas con $5,04 \times 10^{10}$ nanopartículas por mililitro.

Para esta concentración de nanopartículas, 8 veces más diluida que la primera prueba, las células siguen conservando su morfología sin cambios aparentes aún hasta un volumen agregado de 200 μL . Para las células incubadas con 300 μL de nanopartículas se empieza a observar una reducción en la densidad de células, pero sin claros signos de muerte celular.

Los resultados de esta sección no solo demuestran la biocompatibilidad de la formulación prototipo, sino que también permiten establecer un umbral de tolerancia para esta preparación de cultivo celular específica de hasta 30 μL de la suspensión (en las condiciones prototipo). Al diluir la suspensión, este umbral aumenta de manera proporcional a dicha dilución. Los resultados de esta sección no solo permiten demostrar uno de los requisitos del QTPP en cuanto a la biocompatibilidad, sino que de manera importante permiten seleccionar el volumen de nanopartículas para incubar con las células en los siguientes experimentos realizados con líneas celulares, descritos en las siguientes sub-secciones.

4.3.3 Evaluación de la internalización celular

4.3.3.1 Citometría de flujo

La internalización de las nanopartículas en células HEK 293T se evaluó mediante citometría de flujo, determinando la eficiencia con la que las nanopartículas pueden entrar en estas células en distintas condiciones. Se emplearon diferentes cantidades de nanopartículas marcadas con Nile Red, a partir de una suspensión con una concentración de $5,04 \pm 0,05 \times 10^{10}$ nanopartículas por mililitro. Acorde con los resultados previos de citotoxicidad, las células se incubaron con 50, 30 y 10 μL de nanopartículas por un periodo de dos horas. Se probaron tanto muestras de nanopartículas vacías, como nanopartículas encapsulando tRNA para evaluar si existen diferencias en la internalización por la presencia de tRNA. Los resultados se muestran en la Figura 86.

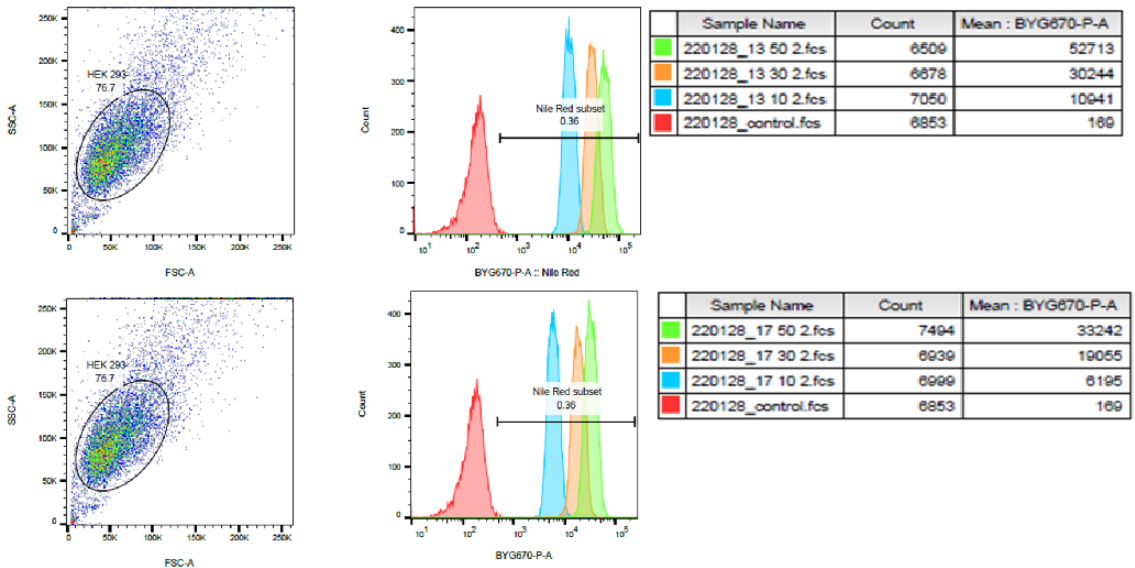


Figura 86: Análisis de citometría de flujo para la evaluación de la internalización de nanopartículas por las células HEK 293T.

En las imágenes superiores (parte A) se muestran los análisis correspondientes a un lote de nanopartículas vacías, mientras que la parte inferior (parte B) incluyen muestras encapsulando tRNA. A la izquierda en ambas partes se muestran los diagramas de dispersión frontal y lateral que identifican la población celular seleccionada para el análisis. Los histogramas de la derecha muestran la distribución de las células que han internalizado las nanopartículas marcadas con fluoróforo. Las imágenes muestran un corrimiento total del pico de células control comparado con todos los volúmenes de ambos tipos de nanopartículas evaluadas. Notablemente, el corrimiento a la derecha es superior conforme se administra mayor cantidad de nanopartículas (mayor intensidad de fluorescencia). Además, no se observa diferencia entre el comportamiento de las nanopartículas vacías y encapsulando tRNA.

El corrimiento total del pico de células control refleja un porcentaje de células transfectadas de prácticamente el 100%, lo cual demuestra el potencial de este vehículo para aplicaciones biomédicas. Que el desplazamiento del histograma a la derecha sea mayor con un mayor volumen de muestra (es decir, con más cantidad de nanopartículas) quiere decir que el mecanismo de entrada de las nanopartículas a las células no alcanza saturación en las condiciones evaluadas, pues hay una mayor fluorescencia (por lo tanto, un mayor ingreso de nanopartículas) con volúmenes mayores. Además, el análisis demuestra que la presencia o no de RNA encapsulado no parece tener ningún efecto ni sobre el porcentaje de transfección, ni en la cantidad de nanopartículas que ingresan a las células, pues las intensidades de los mismos volúmenes de ambos tipos de nanopartículas (con y sin RNA) son comparables. Este resultado sugiere que el contenido de las nanopartículas no influye las propiedades relacionadas con la captación celular y es esencial tanto para extrapolar observaciones realizadas con nanopartículas vacías, como para evaluar el potencial de aplicación de esta formulación para otras aplicaciones de vehiculización.

4.3.3.2 Microscopía confocal

De manera complementaria, se realizó una prueba para visualizar la distribución de las nanopartículas dentro de las células. Se utilizaron nanopartículas con el fluoróforo Cy5, y se amplió la investigación incluyendo también células hCMEC/D3 (línea celular endotelial derivada de microvasos del lóbulo temporal humano) y células neuronales SH-SY5Y, además de las células HEK 293T. Se incubaron las células con 30 μL de nanopartículas a una concentración de aproximadamente $5,04 \pm 0,05 \times 10^{10}$ nanopartículas por mL para luego ser fijadas y observadas mediante microscopía confocal. Los resultados se presentan de la Figura 87 a la Figura 89.

Estas imágenes muestran una considerable cantidad de nanopartículas en el citoplasma de las células. En el caso de las células HEK 293T, esto corrobora los resultados de citometría de flujo observándose una alta y uniforme transfección en todas las células captadas. Aunque la intensidad observada en las imágenes de células hCMEC/D3 es menor, lo cual es esperado debido a sus propiedades de barrera, resulta prometedor observar que todas las células observadas poseen nanopartículas en su interior. Esto podría ser un indicador de su potencial para atravesar la BHE. Y más allá de la barrera, su potencial para dirigirse a células de naturaleza neuronal también presenta un interesante potencial con los resultados observados en células SH-SY5Y. Aunque se reporta que estas células muestran una capacidad de captación inferior a la de las células HEK 293T, estos resultados sugieren que el vehículo diseñado es un medio apropiado para dirigirse hacia este tipo de dianas celulares.

4.3.4 Pruebas de silenciamiento génico

La capacidad de las nanopartículas lipídicas para el silenciamiento génico se probó específicamente con el silenciamiento del gen TCERG1 en células HEK 293T. Para las pruebas, las nanopartículas fueron cargadas con siRNA a una concentración de 1,568 $\mu\text{mol/L}$ de siTCERG1, y una cantidad de nanopartículas aproximada de $5,04 \pm 0,05 \times 10^{10}$ nanopartículas por mililitro (aproximadamente 5 mM de lípidos totales). Como control negativo se utilizaron nanopartículas con las mismas características cargadas con siGFP y como control positivo se empleó lipofectamina con siTCERG1. En cada muestra se agregó 0,1 nanomoles teóricos de siRNA, y se observaron los niveles de expresión de proteína mediante *Western blot* (Figura 90) y de expresión de RNA mediante qPCR (Figura 91).

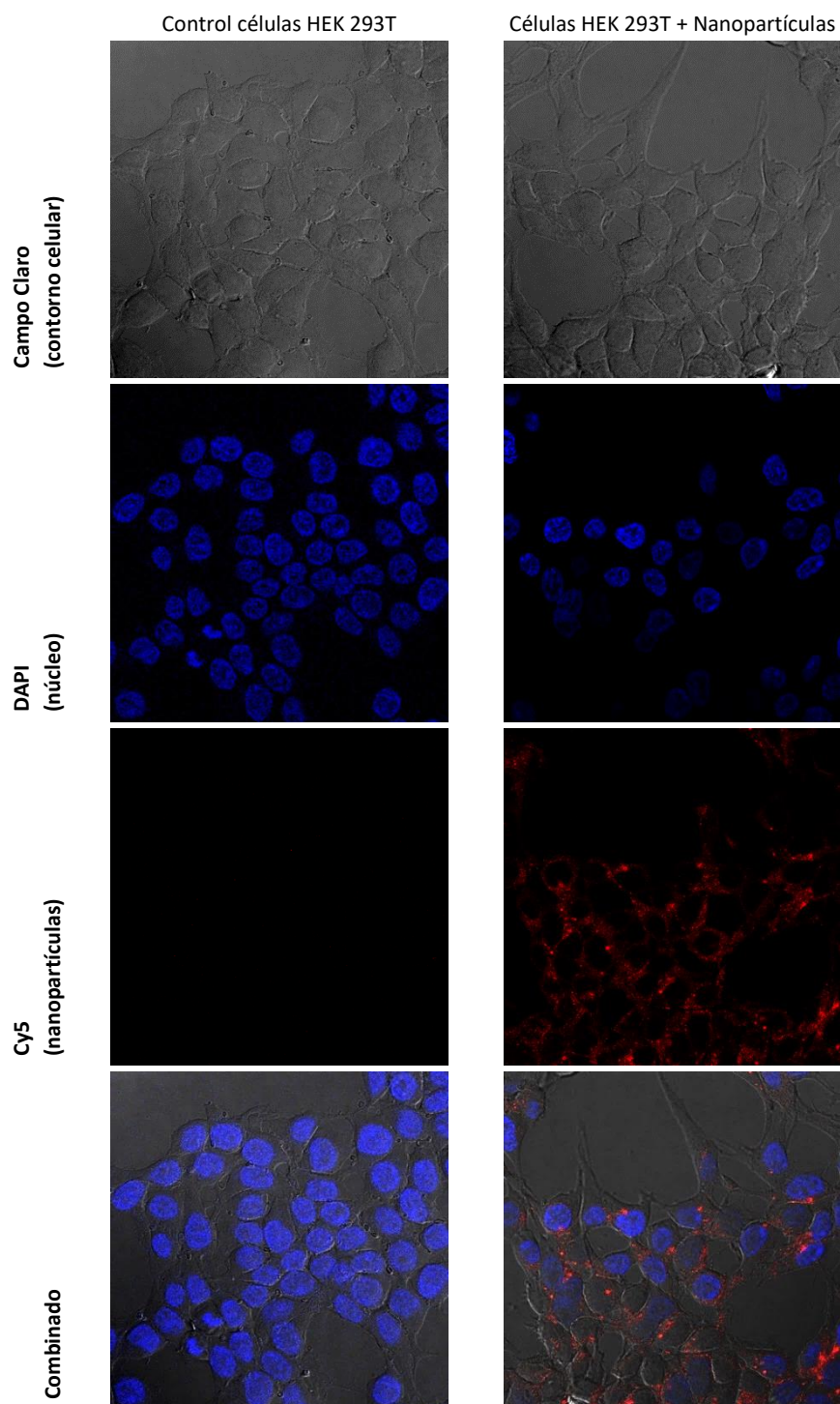


Figura 87: Evaluación de la internalización de nanopartículas en células HEK 293T por de microscopía confocal.

A la izquierda se muestran las células control sin nanopartículas, y a la derecha células incubadas con 30 μ L de nanopartículas. Los cuatro paneles de arriba hacia abajo ilustran en forma descendiente la morfología celular en el campo claro, los núcleos celulares teñidos de azul con DAPI, las nanopartículas resaltadas en rojo (Cy5), y la imagen combinada las tres imágenes anteriores. Esta última demuestra una considerable internalización de las nanopartículas, visibles de forma individual y como grupos de intenso color rojo dentro del citoplasma, demostrando una alta capacidad de penetración y distribución dentro de las células.

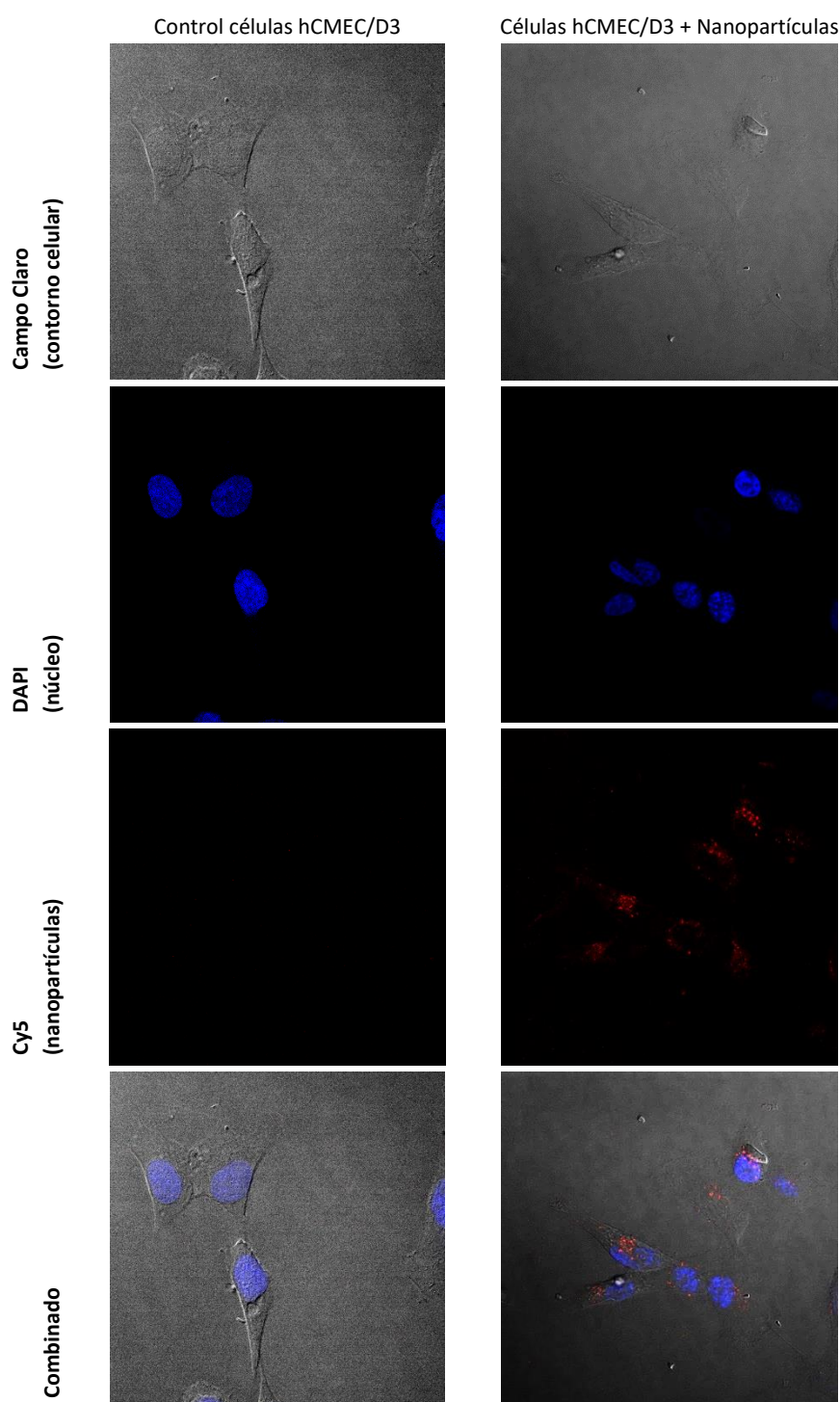


Figura 88: Evaluación de la internalización de nanopartículas en células hCMEC/D3 por microscopía confocal.

Estas células se incluyen para observar la capacidad de las nanopartículas de ingresar en una línea celular que muestra menor capacidad de captación, debido a sus propiedades de barrera. A la izquierda se muestran las células control sin nanopartículas, y a la derecha células incubadas con nanopartículas. Los cuatro paneles de arriba hacia abajo ilustran en forma descendiente la morfología celular en el campo claro, los núcleos celulares teñidos de azul con DAPI, las nanopartículas resaltadas en rojo (Cy5), y la imagen combinada las tres imágenes anteriores. Esta última demuestra la internalización de las nanopartículas, visibles de forma individual y como grupos dentro del citoplasma. Cabe resaltar que, a pesar de apreciarse la internalización de las nanopartículas, la intensidad de la señal es menos pronunciada en comparación con las observaciones células HEK 293T.

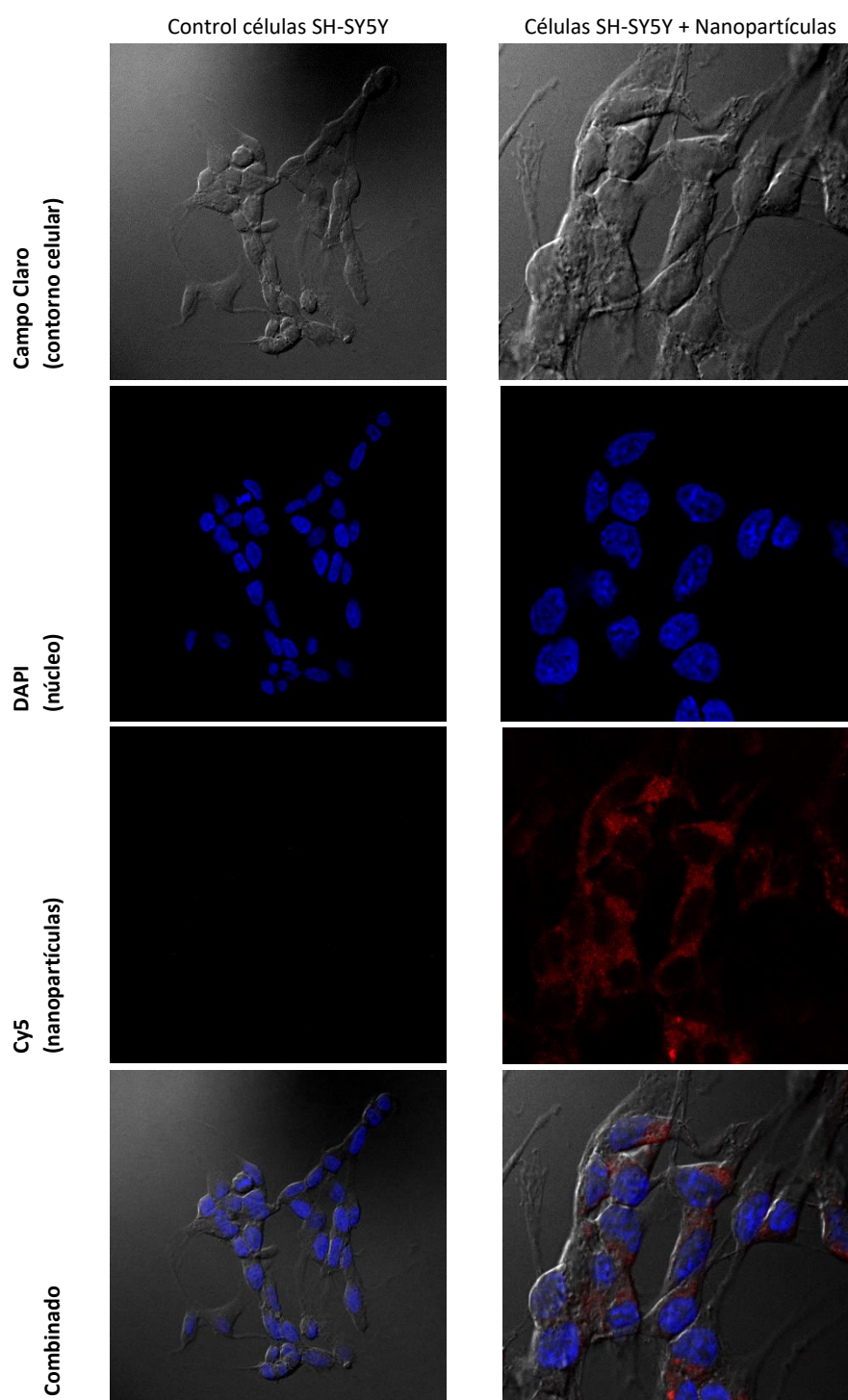


Figura 89: Evaluación de la internalización de nanopartículas en células SH-SY5Y por microscopía confocal.

A la izquierda se muestran las células control sin nanopartículas, y a la derecha células incubadas con nanopartículas. Los cuatro paneles de arriba hacia abajo ilustran en forma descendiente la morfología celular en el campo claro, los núcleos celulares teñidos de azul con DAPI, las nanopartículas resaltadas en rojo (Cy5), y la imagen combinada las tres imágenes anteriores. Esta última demuestra la internalización de las nanopartículas, visibles de forma individual y como grupos de intenso color rojo dentro del citoplasma. Al igual que en el caso de las células HEK 293T se observa una elevada capacidad de internalización en este tipo de células neuronales.

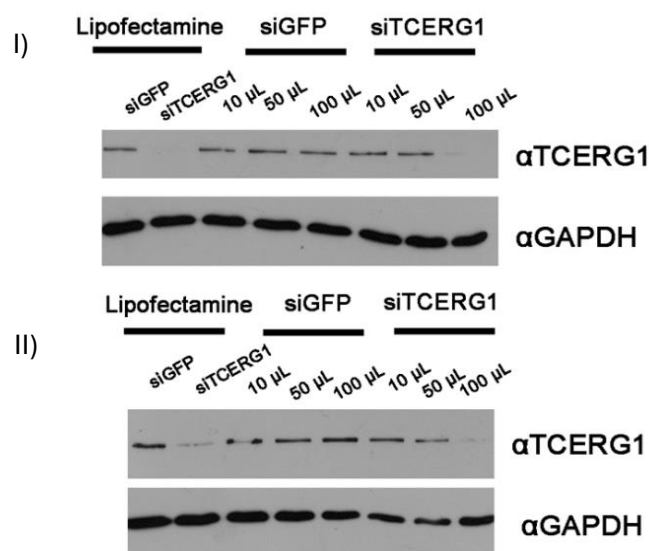


Figura 90: Análisis de *Western Blot* para evaluar el silenciamiento génico mediante las nanopartículas lipídicas
En ambas repeticiones ilustradas se observa una atenuación de la banda correspondiente a la proteína TCERG1 en las muestras tratadas con siTCERG1 empleando lipofectamina, y en ambas muestras tratadas con 100 µL nanopartículas encapsulado siTCERG1, así como la tratada con 50 µL de la placa II. Todas las bandas correspondientes a siGFP se mantienen constantes.

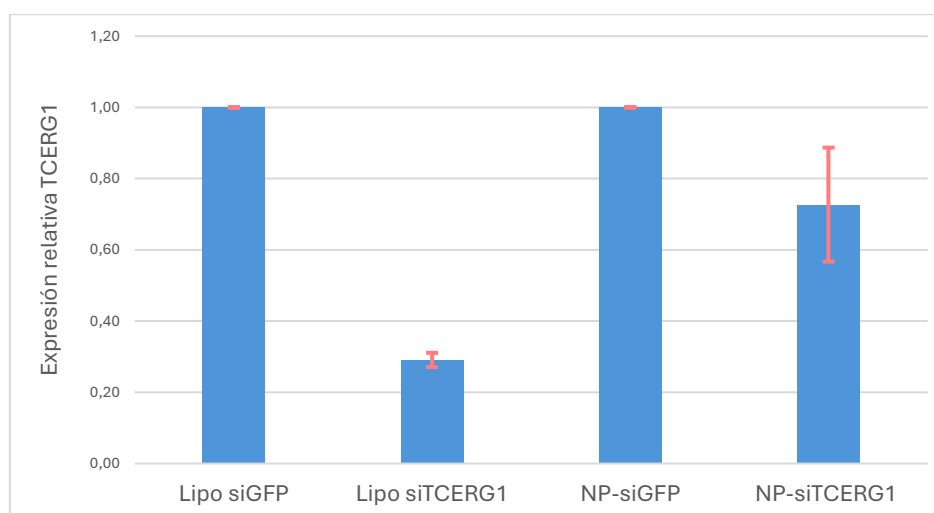


Figura 91: Evaluación cuantitativa de la expresión del gen TCERG1 Mediante qPCR.

En comparación con sus respectivos controles (los que utilizan siGFP), la expresión del gen siTCERG1 se ve reducida tanto en las muestras en que el siRNA se transfectó a través de nanopartículas lipídicas, como con las muestras transfectadas con lipofectamina (reducción más marcada).

Los resultados demostraron que las nanopartículas poseen capacidad de liberar el siRNA y propiciar el silenciamiento génico. En el caso del *Western blot* la “dosis” de 100 µL de nanopartícula vehiculizando siTCERG1 mostró un borramiento notable de la banda correspondiente, lo que indica el silenciamiento y correspondiente reducción de la expresión de la proteína diana. Aunque es cierto que los resultados de la qPCR sugieren la necesidad de optimizar la prueba y el cálculo de muestra a la luz del conocimiento en cuanto a la eficiencia en términos absolutos de RNA. Sin embargo, estos resultados constituyen una importante motivación para avanzar en el desarrollo de más investigaciones para evaluar la efectividad y especificidad del silenciamiento génico empleando este vehículo para aplicaciones específicas.

4.3.5 Evaluación *in vitro* de la permeabilidad a través de la BHE

La capacidad de las nanopartículas lipídicas de cruzar la BHE *in vitro* se evaluó en un modelo de co-cultivo de células endoteliales y pericitos. Una alta permeabilidad relativa del modelo, en los controles con *lucifer yellow*, así como la alta variabilidad entre las diferentes repeticiones del ensayo (ver Anexo 1, Figura A 15) sugieren cautela en la interpretación de los resultados observados en la Figura 92.

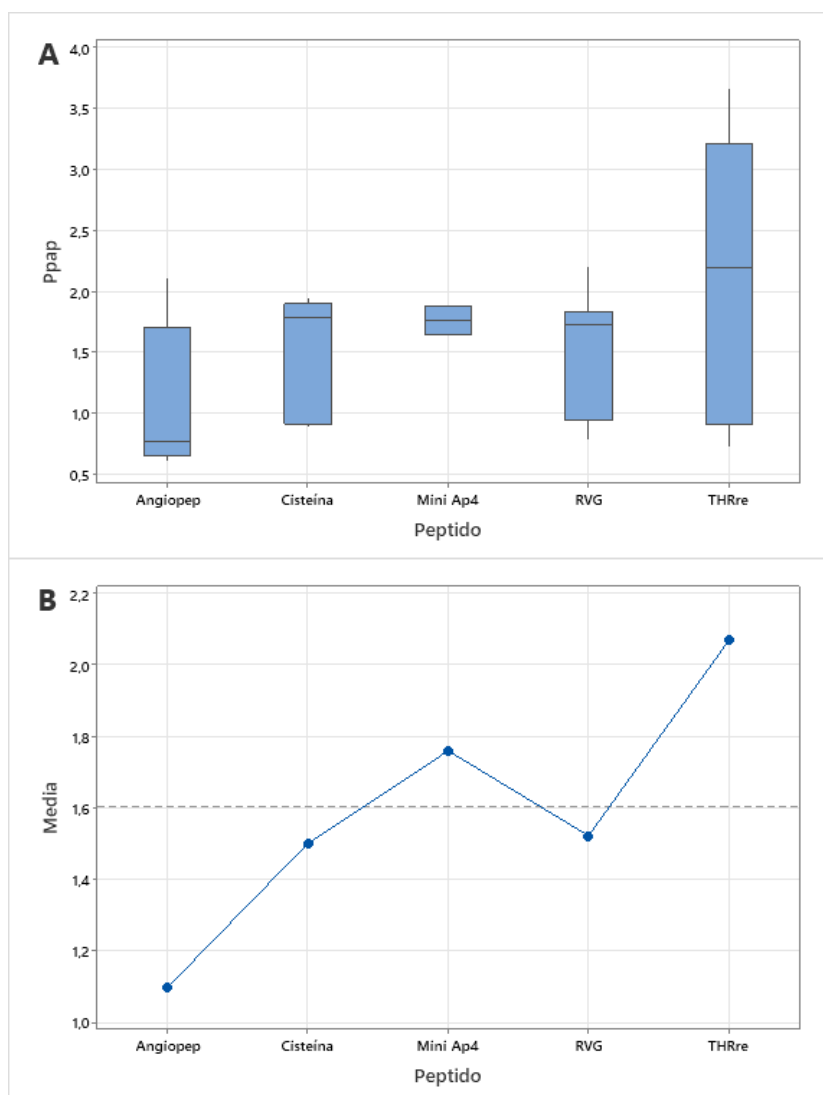


Figura 92: Evaluación comparativa de la permeabilidad aparente a través del modelo *in vitro* de BHE de las nanopartículas funcionalizadas con diferentes péptidos.

A) La gráfica de cajas ilustra la dispersión de los valores de permeabilidad aparente de cada péptido, en tres ensayos distintos (ver detalles adicionales en el Anexo 1, Figura A 15). La superposición observada en las cajas de la gráfica indica que los rangos de permeabilidad aparente se traslapan entre los diferentes péptidos analizados. B) La visualización de los efectos principales a partir de las medias permite visualizar más fácilmente la tendencia obtenida con la media de cada grupo. Sin embargo, el análisis de varianza señala que las diferencias observadas no son estadísticamente significativas (valor $p > 0,05$), lo que sugiere cautela en la interpretación de resultados.

Los resultados obtenidos con este modelo preliminar muestran que, aunque la media observada para péptido el THRre sugiere un valor de permeabilidad mayor, particularmente en el segundo ensayo (Figura A 15, Anexo 1), la falta de consistencia en los resultados genera dudas sobre la fiabilidad de estos datos. Ciertamente, la variabilidad de los datos impide asignarles a estas diferencias una significancia estadística (valor $p > 0,05$). De manera similar, los resultados

relacionados con el Angiopep 2 en los ensayos 1 y 3 (ensayos 1 y 3, Figura A 15, Anexo 1) muestran una permeabilidad aparente menor que los otros péptidos, pero de igual manera no corresponde a una diferencia significativa a la luz de los datos generales para todos los péptidos (valor $p > 0,05$). Aunque algunas repeticiones sugieren que podría haber diferencias dependiendo del péptido utilizado, el conjunto actual de datos, obtenido bajo las condiciones descritas, no permite determinar con certeza estas diferencias.

A pesar de esta variabilidad entre muestras y ensayos, los resultados ilustran que las nanopartículas muestran la capacidad para cruzar la BHE según este modelo *in vitro*, lo que constituye un importante avance en el cumplimiento del QTPP del desarrollo. Aunque estos resultados deben interpretarse con cautela, proporcionan un estímulo para progresar hacia modelos más complejos y representativos como los ensayos *in vivo*. La incertidumbre relacionada con los datos de esta sección se convierte también en una justificación a ese avance, ya que estos ensayos *in vivo* ofrecen un entorno más controlado y menos susceptible a variaciones.

4.3.6 Evaluación *in vivo* de la permeabilidad a través de la BHE

El potencial de las nanopartículas para cruzar la BHE fue evaluado mediante estudios de biodistribución en un ambiente complejo como lo es un organismo vivo. Para ello, se desarrolló un protocolo específico de administración que incluye el esquema de dilución de muestra, volumen aplicado y tiempos de observación adaptado a la formulación específica y al modelo animal aplicado. Las pruebas se realizaron tanto en nanopartículas sin funcionalizar como con nanopartículas funcionalizadas.

4.3.6.1 Biodistribución de las nanopartículas sin funcionalizar

Para estos estudios se utilizó una fórmula que contenía 6% de DSPE-mPEG-2000-MAL, aplicando el protocolo de tratamiento de muestra y administración señalado en la Tabla 13 (sección 3.2.4.9), y que fue definido según lo descrito en el Anexo 1, específicamente en la Tabla A 5, Tabla A 6, y desde la Figura A 16 a la Figura A 18. Los resultados *in vivo* y *ex vivo* obtenidos en estas pruebas de biodistribución se presentan de la Figura 93 a la Figura 97, y en la Tabla 44.

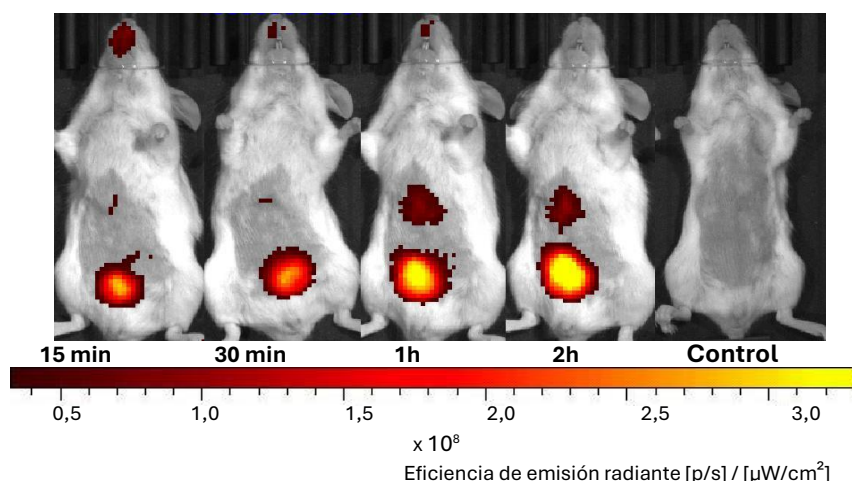


Figura 93: Evaluación mediante imágenes *in vivo* de la biodistribución durante 2 horas de nanopartículas sin funcionalizar. Ratón 1.

Las imágenes de fluorescencia muestran una concentración inicial concentrada en la zona abdominal del animal, con intensidad notable en la zona correspondiente a la vejiga urinaria, y una creciente en la zona que probablemente corresponda al hígado.

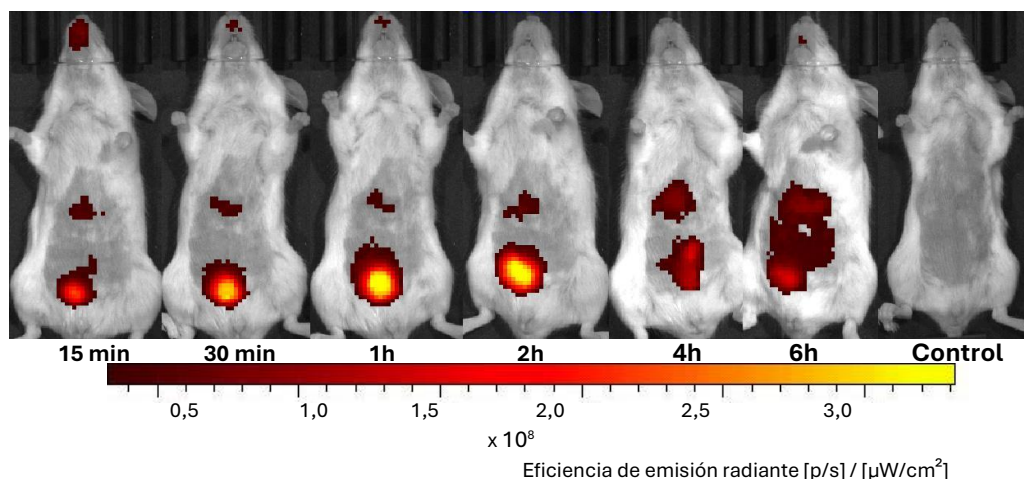


Figura 94: Evaluación mediante imágenes *in vivo* de la biodistribución durante 6 horas de nanopartículas sin funcionalizar. Ratón 2.

Los datos hasta 2 horas de este segundo sujeto de experimentación confirman los hallazgos del ratón 1. Adicionalmente, muestran una reducción considerable de la señal observada en la zona de la vejiga urinaria a partir de las cuatro horas, y la acumulación de una nueva señal alrededor de la zona intestinal a partir de las 6 horas.

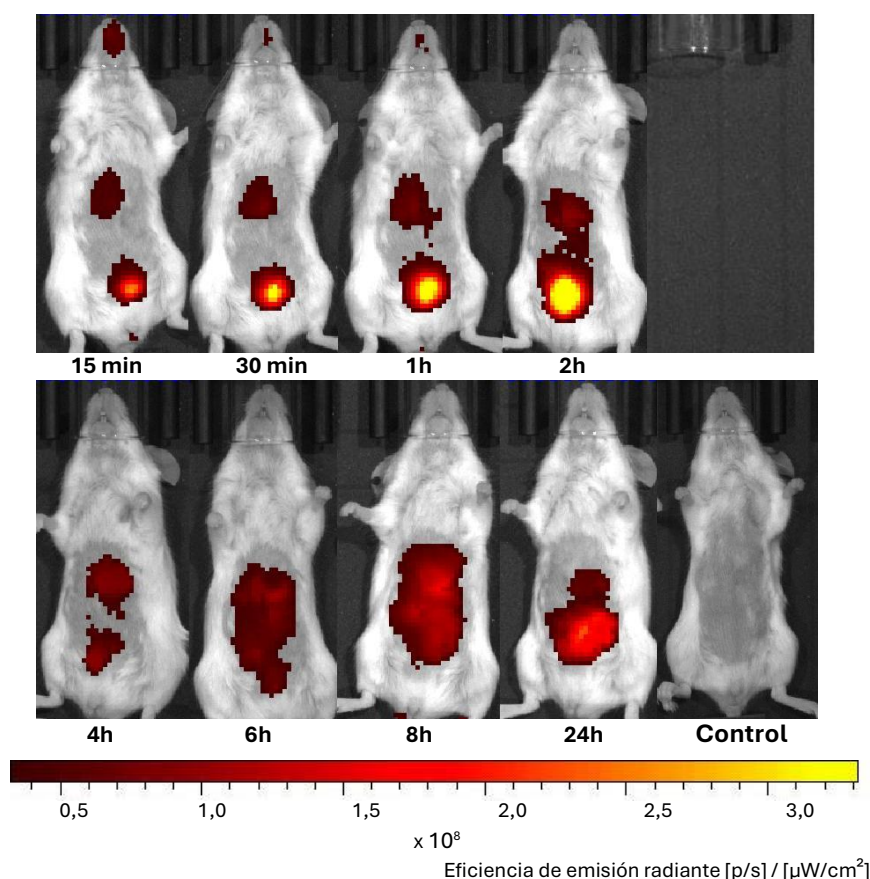


Figura 95: Evaluación mediante imágenes *in vivo* de la biodistribución durante 24 horas de nanopartículas sin funcionalizar. Ratón 3.

Hasta las 4 y las 6 horas, se observan resultados coincidentes con lo observado en los ratones 1 y 2. Los tiempos de observación adicionales revelan un aumento de la intensidad de la señal correspondiente a la zona intestinal hacia las 24 horas.

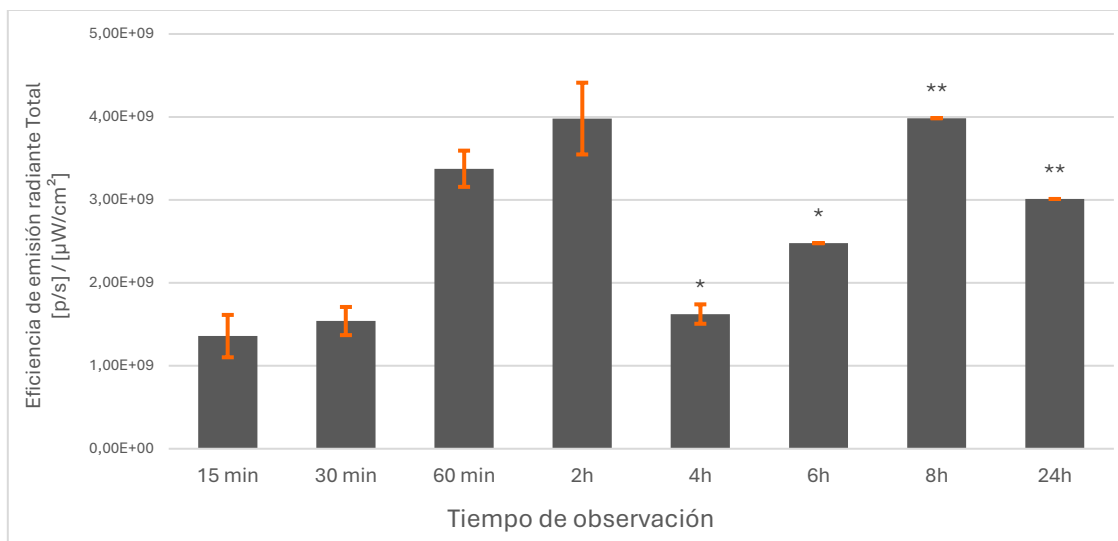


Figura 96: Fluorescencia total captada durante la prueba de biodistribución de nanopartículas sin funcionalización durante 24 horas.

Se muestra la intensidad de fluorescencia captada de la imagen del ratón completo en distintos tiempos de observación de la biodistribución de las nanopartículas. Se observan picos de intensidad a las 2 y las 8 horas. En conjunto con las figuras Y66 a Y68, esta gráfica ilustra la fluctuación en la distribución de las nanopartículas debido a los cambios en los patrones de acumulación y excreción. Los valores hasta las 2 horas representan el promedio de tres ratones, mientras que los datos a las 4 y 6 horas provienen de dos ratones (*), y las mediciones a las 8 y 24 horas son de un solo ratón (**).

Tabla 44: Valores de intensidad de fluorescencia *ex vivo* de órganos extraídos de animales 2, 6 y 24 horas post-administración.

Órgano	Intensidad de fluorescencia <i>ex vivo</i> (x 10 ⁶) [p/s/cm²/sr] / [μW/cm²]		
	2 horas	6 horas	24 horas
Bazo	36,36	37,72	0,00
Cerebro	21,46	21,02	8,63
Hígado	48,94	54,44	166,00
Intestinos	67,20	34,83	48,95
Riñón 1	72,06	49,49	68,75
Riñón 2	58,45	51,28	71,91

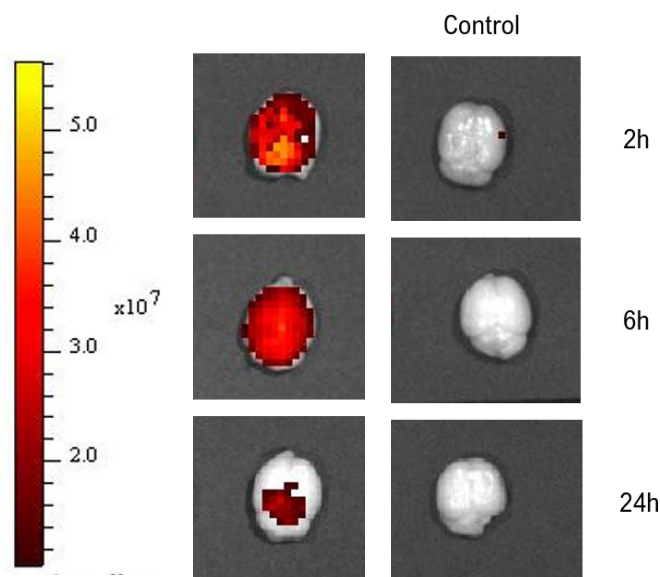


Figura 97: Acumulación de nanopartículas sin funcionalizar en cerebros de ratones 2, 6 y 24 horas post-administración.

Se muestran los datos de intensidad de fluorescencia *ex vivo* de cerebros extraídos de ratones sacrificados a las 2, 6 y 24 horas después de la administración de nanopartículas. Previo a la extracción de los cerebros, cada animal fue perfundido con PBS 1X para eliminar la sangre de los vasos sanguíneos, asegurando que las mediciones no incluyen material que pudiera estar acumulado en la parte externa de la BHE.

Los resultados desde la Figura 93 hasta la Figura 95 demuestran cómo la acumulación de las nanopartículas en el cuerpo del ratón varía con el tiempo. Inicialmente, se observa una acumulación en la zona baja del abdomen, que disminuye después de dos horas, sugiriendo un posible mecanismo de aclaramiento renal rápido. Posteriormente, se detecta una acumulación en la zona superior del abdomen, lo que podría indicar un proceso de metabolismo hepático seguido de excreción fecal. Según la Figura 96, se alcanza un pico de intensidad total a las 2 horas, coincidiendo con el máximo de acumulación renal observada. Las intensidades más bajas posteriores sugieren una redistribución hasta que, a las 8 horas, se observa otro pico debido a la acumulación en el hígado y los intestinos.

La Tabla 44 evidencia la distribución en diversos órganos examinados *ex vivo*, destacando la acumulación progresiva en el hígado previamente mencionada (ver también Figura A 19, Anexo 1). Además, y de manera alentadora, se detecta una acumulación significativa en el cerebro, incluso en estas nanopartículas no funcionalizadas, como se muestra además en la Figura 97. Partiendo de este protocolo de observación y manejo de muestras, estos resultados permiten avanzar hacia la evaluación de la biodistribución de nanopartículas funcionalizadas.

4.3.6.2 Biodistribución de las nanopartículas funcionalizadas

Para este estudio se partió de la misma fórmula base empleada en la sección 4.3.6.1 y el mismo protocolo de administración. Previo a la diálisis final, las nanopartículas fueron funcionalizadas con los péptidos RVG y el MiniAp-4. Adicionalmente se incluyó una muestra de nanopartículas incubadas con cisteína para bloquear la maleimida libre. Los resultados *in vivo* y *ex vivo* obtenidos en estas pruebas de biodistribución se presentan de la Figura 98 a la Figura 102, y en la Tabla 45.

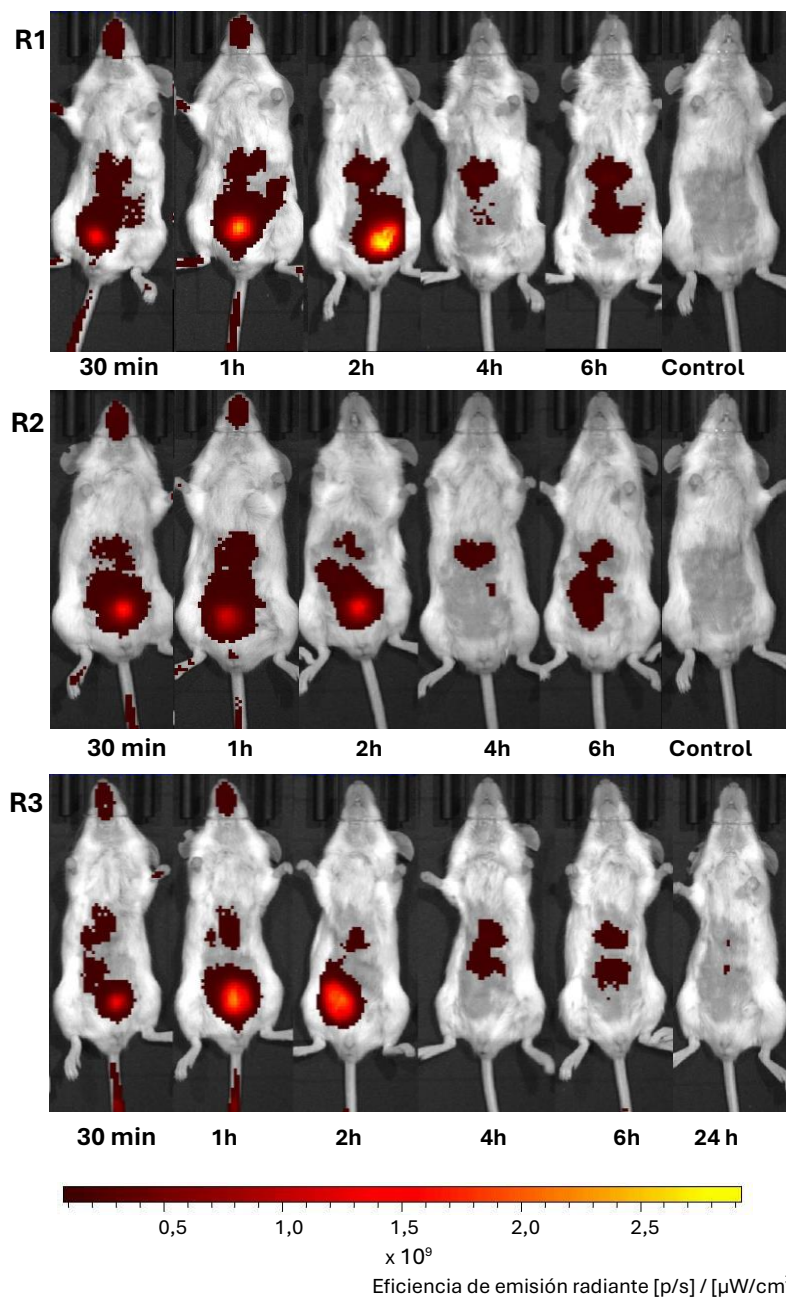


Figura 98: Evaluación mediante imágenes *in vivo* de la biodistribución durante 24 horas de nanopartículas funcionalizadas con péptido RVG.

Las imágenes muestran la fluorescencia observada hasta 6 horas (ratones 1 y 2) y 24 horas (ratón 3) post-administración. Se observa una acumulación inicial en vejiga urinaria hasta las dos horas (inclusive). Posteriormente a esto, se observa una acumulación en la zona correspondiente a los intestinos e hígado, que es de una intensidad muy baja a las 24 horas. El patrón general es consistente con lo observado en las nanopartículas sin funcionalizar.

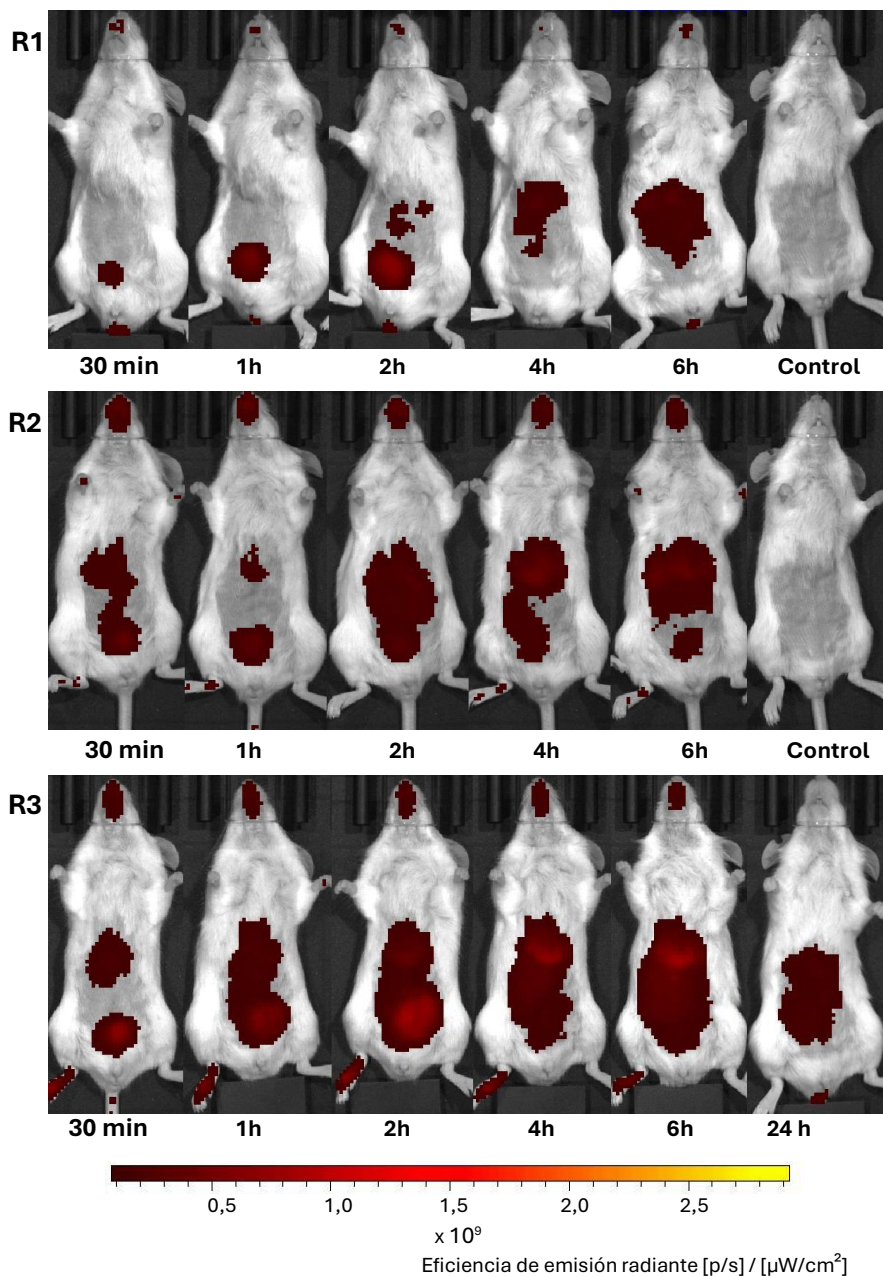


Figura 99: Evaluación mediante imágenes in vivo de la biodistribución durante 24 horas de nanopartículas funcionalizadas con péptido MiniAp-4.

Las imágenes muestran la fluorescencia observada hasta 6 horas (ratones 1 y 2) y 24 horas (ratón 3) post-administración. A lo largo de este período se mantiene un patrón de acumulación similar a lo observado en las condiciones anteriores. Se mantiene una acumulación inicial a nivel de vejiga, de hasta dos horas. La señal de acumulación en la zona abdominal de las 24 horas se ve con mayor intensidad en comparación con lo observado en la Figura 98.

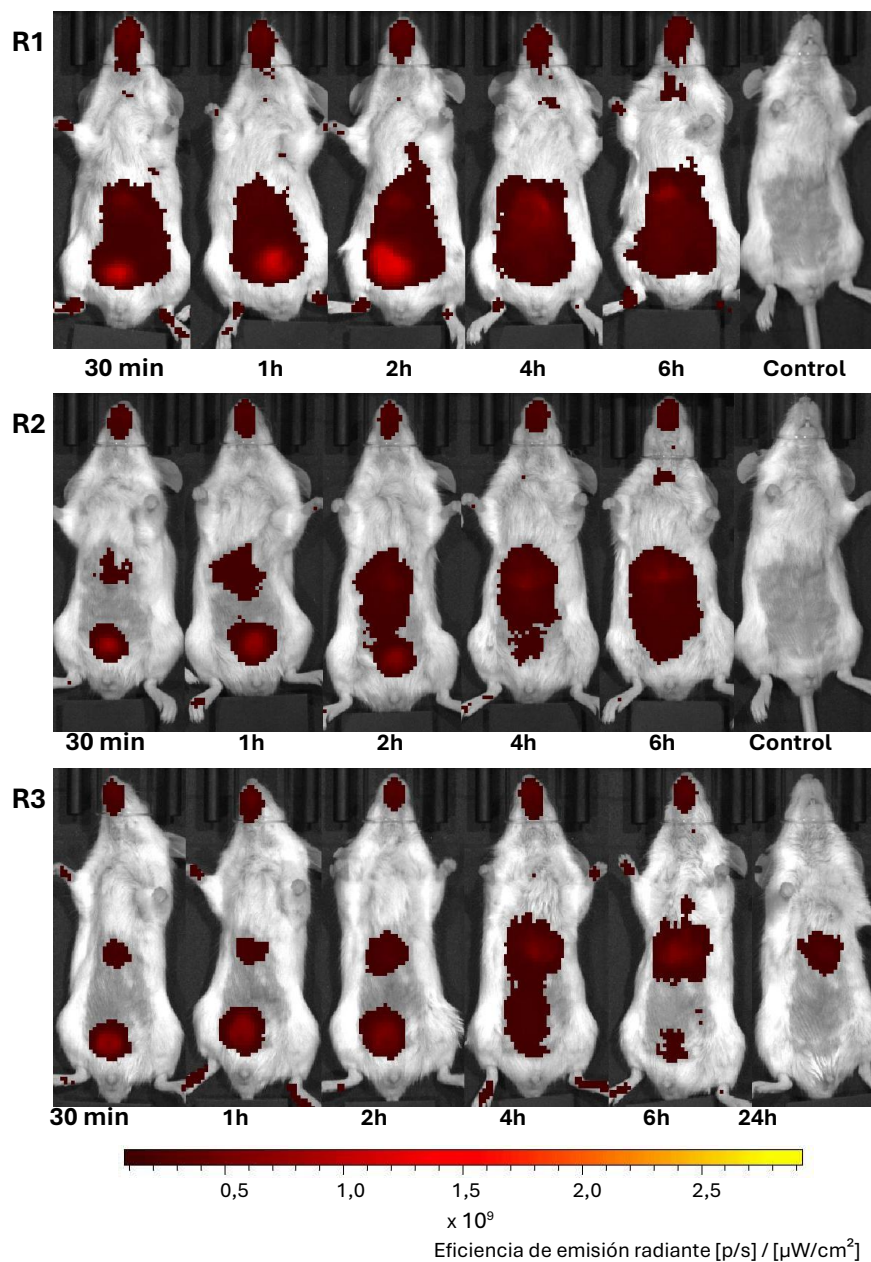


Figura 100: Evaluación mediante imágenes in vivo de la biodistribución durante 24 horas de nanopartículas cuya maleimida libre fue bloqueada por cisteína.

Las imágenes muestran la fluorescencia observada hasta 6 horas (ratones 1 y 2) y 24 horas (ratón 3) post-administración. A lo largo de este período se mantiene un patrón de acumulación similar a lo observado en las condiciones anteriores.

Los resultados observados desde la Figura 98 hasta la Figura 100 muestran el perfil de acumulación de las nanopartículas, captado por la imagen *in vivo* del cuerpo del ratón. En ella se observa un patrón de acumulación similar a lo observado en la sección 4.3.6.1. En cada uno de los 3 grupos analizados se observa una acumulación inicial principalmente en la zona del abdomen bajo, lo cual puede ser un indicio de excreción inicial a través de la vía renal. Posteriormente, se nota una acumulación en la parte principalmente en la zona alta del abdomen, lo que sugiere un posible metabolismo por la vía hepática seguido de excreción intestinal. Si bien es cierto que se observan diferencias en las intensidades de eficiencia de emisión radiante entre las 3 gráficas, estas diferencias en los valores absolutos deben interpretarse con cautela, debido a diferencias en la intensidad fluorescente de la dosis administrada en cada grupo, según la observación que se detalla a continuación.

Durante la preparación de las muestras para su administración, y específicamente durante la filtración esterilizante, se notó un cambio en las características organolépticas de la suspensión de nanopartículas. Visualmente, estas suspensiones muestran una apariencia translúcida con una coloración de azulada a celeste, debido a la presencia de Cy5. Antes de la filtración, las apariencias de las tres suspensiones eran comparables. Sin embargo, después de este paso se observó una disminución en la intensidad del color de las muestras correspondientes a RVG y MiniAp-4. Este cambio fue corroborado mediante mediciones de fluorescencia de 100 μ L de suspensión usando el lector de microplacas Infinite F200 (Tecan) con una longitud de onda de excitación de 651 nm y 670 nm de emisión. Estos resultados mostraron valores de fluorescencia promedio de 43940 unidades relativas de fluorescencia (RFU) para la muestra con cisteína, 35748,5 RFU para el MiniAp-4 y 33934,5 RFU para el RVG. Inicialmente se consideró que esto podría deberse a una exclusión por tamaño. Sin embargo, no se observó diferencia significativa de tamaño de partícula entre las diferentes muestras, ni entre cada muestra antes y después del filtrado. La diferencia de intensidad, y por lo tanto de la cantidad de nanopartículas, posiblemente se debió a una adsorción por el filtro empleado durante la filtración esterilizante (celulosa). Este parámetro fue inadvertidamente omitido durante el análisis de riesgos y, por lo tanto, omitido también del diseño experimental. Las implicaciones de esta omisión y los aprendizajes derivados para futuras investigaciones se abordarán en la discusión de esta tesis.

Para mejorar la comparabilidad de los resultados observados, se normalizaron los datos en función de la dosis administrada. Esto se realizó mediante la relativización de los valores captados respecto a la fluorescencia promedio de cada suspensión a administrar, empleando la Ecuación 7. Esta normalización es fundamental para mitigar la variabilidad observada en la cantidad administrada, causada por la no consideración del efecto de adsorción del filtro. Esta medida permite una comparación menos imprecisa del efecto relativo de cada una de las estrategias de funcionalización evaluadas. Los datos totales representados como intensidad fluorescente corregida (ifc) se presentan en la Figura 101.

Estos resultados sugieren que existen diferencias en el patrón de acumulación en función de la estrategia empleada para la funcionalización, y posiblemente la dosis. Particularmente, se observa un patrón distintivo en los ratones tratados con RVG, con los valores más altos de intensidad hacia las primeras dos horas, seguidas de una marcada disminución posterior. Para complementar estos hallazgos y brindar una medida más específica de los cambios en la acumulación se realizó el análisis de la fluorescencia *ex vivo* presentada en la Tabla 45 y la Figura 102.

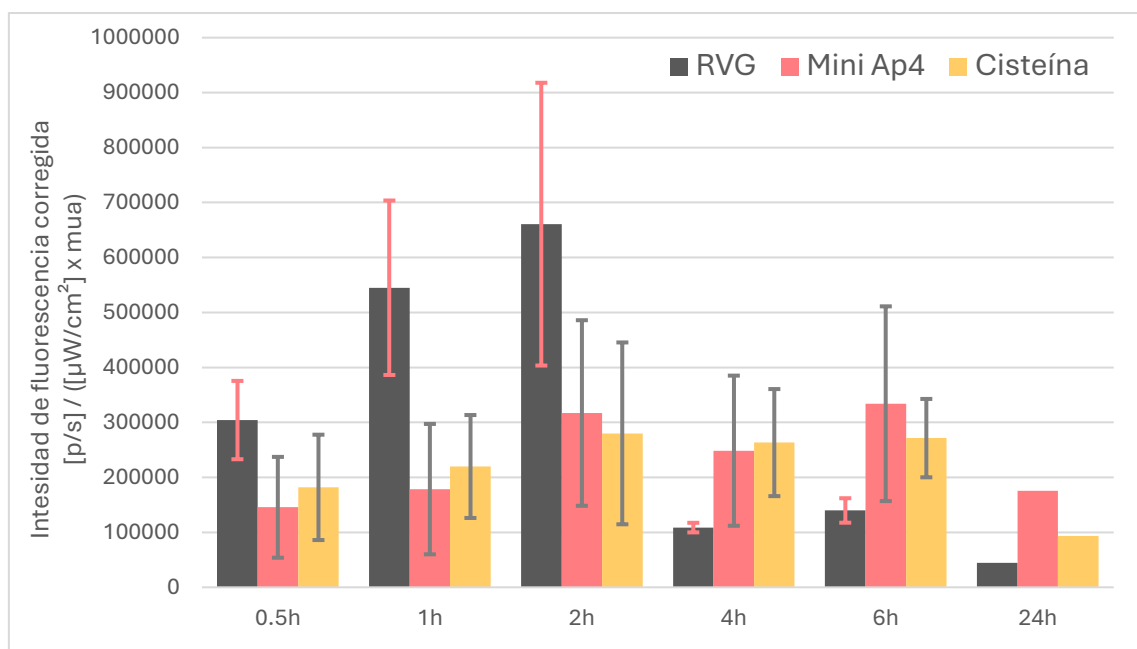


Figura 101: Intensidad de fluorescencia corregida durante la prueba de biodistribución durante 24 horas de nanopartículas funcionalizadas con RVG, MiniAp-4 y con la maleimida libre bloqueada por cisteína.

Se muestran los valores de intensidad de fluorescencia captada de la imagen del ratón completo en distintos tiempos de observación, normalizada con el valor de fluorescencia de la suspensión de nanopartículas administrada para cada grupo. El RVG muestra una intensidad relativa mayor durante las primeras horas, con un pico a las 2 horas y una posterior caída considerable. Por otro lado, aunque el MiniAp-4 parece alcanzar la intensidad máxima también a las 2 horas, el aumento es menos marcado y los valores máximos se mantienen relativamente constantes al menos hasta las 6 horas, similar a lo que también se observa en las muestras con cisteína. Las observaciones correspondientes a 1 hora presentan diferencias significativas entre sí (valor $p < 0,05$), siendo el promedio del RVG significativamente al del MiniAp-4 y cisteína, que no difieren significativamente entre sí. Debido a la variabilidad de los datos, el resto de las diferencias observadas no poseen significancia estadística. Los valores hasta las 6 horas representan el promedio de tres ratones por condición, mientras que los datos a las 24 horas provienen un solo ratón por condición.

Tabla 45: Valores de intensidad de fluorescencia corregida *ex vivo* de órganos extraídos de animales 2, 6 y 24 horas post-administración de nanopartículas nanopartículas funcionalizadas con RVG, MiniAp-4 y con la maleimida libre bloqueada por cisteína.

Órgano	Intensidad de fluorescencia corregida <i>ex vivo</i> [p/s/cm ² /sr] / ([μW/cm ²] x RFU)					
	RVG		MiniAp-4		Cisteína	
	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h
Bazo	ND	ND	3.8475,74	ND	3.588,98	1.261,95
Cerebro	208,49	68,51	546,60	156,93	1.167,39	879,84
Intestinos	2.357,04	ND	ND	4.554,04	6.079,88	982,48
Hígado	9.250,17	ND	38.770,86	ND	36.208,47	2.206,19
Riñón 1	3.080,20	ND	15.379,67	5.748,49	8.932,64	2.196,40
Riñón 2	4.785,69	2.459,15	11.336,14	6.095,36	40.282,20	6.579,43

Notas: ND = No Detectado

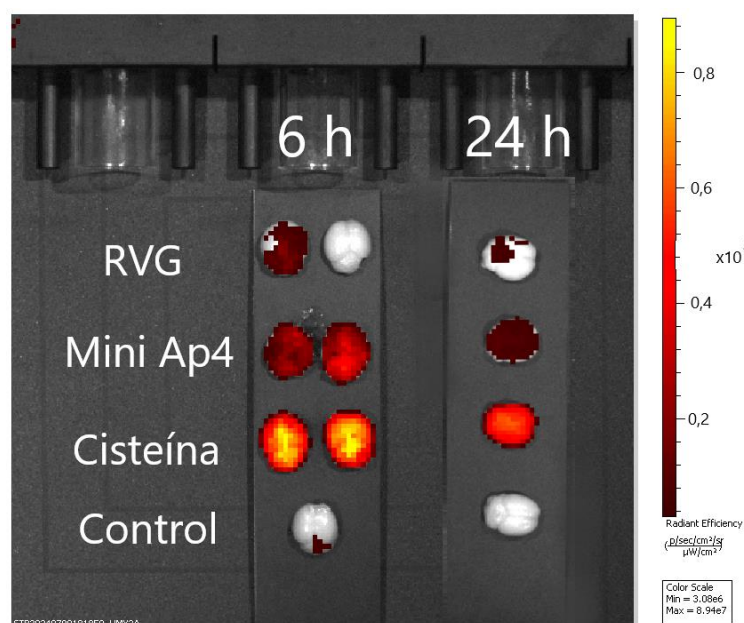


Figura 102: Acumulación de nanopartículas funcionalizadas con RVG, MiniAp-4 y con la maleimida libre bloqueada por cisteína en cerebros de ratones 2, 6 y 24 horas post- administración.

Se muestran los datos absolutos de intensidad de fluorescencia *ex vivo* de cerebros extraídos de ratones sacrificados a las 6 y 24 horas después de la administración de nanopartículas. Se puede observar acumulación a las 6 horas (excepto una de las dos repeticiones del péptido RVG), que se mantiene hasta las 24 horas, aunque con una menor intensidad. Las señales muestran una intensidad variable según el tipo de funcionalización empleada, aunque se debe señalar que las intensidades absolutas no son directamente comparables debido a cambios en la intensidad de fluorescencia de la preparación previa a la administración.

Mientras que los datos observados desde la Figura 98 hasta la Figura 101 podrían incluir material fuera de la circulación sistémica, como el acumulado en la vejiga o en el intestino, los resultados específicos de cada órgano mostrados en la Tabla 45 proporcionan una visión más clara de la intensidad acumulada, ajustada también en base a la fluorescencia de la dosis administrada. En cada órgano examinado, la acumulación tanto relativa como absoluta fue mayor para las muestras funcionalizadas con cisteína. Estos resultados demuestran que el tipo de péptido empleado, y posiblemente la dosis también, influyen en el patrón de acumulación.

Finalmente, la Figura 102 ilustra la acumulación en los cerebros extraídos, mostrando las diferencias en la acumulación absoluta. Estas imágenes, tomadas en órganos perfundidos con PBS y que, por ende, muestran una fluorescencia correspondiente únicamente al material acumulado en el parénquima cerebral, son una prueba directa de la capacidad del vehículo diseñado para superar la BHE, traspasando el desafío considerable que representa su anatomía fisiológica. Esta imagen particular corresponde a un resultado satisfactorio en sí mismo, a la vez que constituye un camino para futuras investigaciones que avancen hacia la optimización del desempeño biológico y prepara el camino para aplicar este vehículo en desarrollos terapéuticos específicos.

Efectivamente, los resultados de esta sección 4.3.6 de manera combinada son una base para continuar con evaluaciones *in vivo* más profundas y estructuradas para discernir sobre la mejor estrategia de funcionalización para cruzar la BHE, y avanzar hacia modelos patológicos y aplicaciones terapéuticas específicas. Representan una importante recopilación de evidencia sobre la capacidad de las nanopartículas diseñadas para acumularse en el SNC, así como también se evidencia su aclaramiento.

Con la demostración de la aplicación práctica para alcanzar objetivos terapéuticos más allá de la BHE se culmina el proceso de desarrollo descrito a lo largo de esta tesis doctoral, que destaca por la aplicación de la filosofía de QbD. Este proceso proporciona una motivación continua que aproveche el conocimiento exhaustivo del proceso de manufactura y de las particularidades del comportamiento biológico de las nanopartículas.

5 Discusión

Esta investigación se enmarca en un contexto de avances acelerados en el campo de la nanobiomedicina aplicada a superar los desafíos relacionados con la presencia de la BHE y su impacto en la restricción de terapias novedosas, como el silenciamiento génico, para el abordaje de trastornos del SNC. La traslación clínica de estos desarrollos depende críticamente de la capacidad para crear formulaciones accesibles y escalables, que permitan reducir los costos de investigación y, en consecuencia, facilitar su implementación en tratamientos reales. En este contexto, los objetivos de este proyecto buscan aportar, de forma integral, hacia la traslación clínica de terapias de silenciamiento génico dirigidas al sistema nervioso central.

Durante la ejecución de este proyecto doctoral se logró el desarrollo de una formulación de nanopartículas que demostró su potencial para el desarrollo de terapias de silenciamiento hacia el SNC. Además, mientras se construía la base de conocimientos que permitió delimitar con precisión el QTPP, se estudió a fondo una variedad de fenómenos alrededor de los parámetros de proceso y de formulación que son relevantes no solo para esta formulación en particular, sino que poseen el potencial de impactar de forma más amplia el campo de la formulación de nanopartículas lipídicas mediante mezcla microfluídica y el desarrollo de terapias que utilizan el direccionamiento activo, como será discutido más adelante.

El desarrollo de nanopartículas es un campo amplio y abundantemente estudiado en la literatura científica. Es además una aplicación biomédica que ha atraído la atención como una posible estrategia para resolver los desafíos que la BHE plantea para el desarrollo de terapias para abordar las enfermedades del SNC, lo que resulta en un considerable volumen de producción académica. Sin embargo, es común encontrar en la literatura que muchos estudios presentan desarrollos de formulaciones de nanopartículas lipídicas donde el proceso de desarrollo galénico no se detalla exhaustivamente, operando en lo que podría considerarse una metodología de “calidad por evaluación”. Esta circunstancia no desmerece su valor académico ni mucho menos su valor práctico. La abundante literatura disponible, con el enfoque particular de cada investigación, es crucial para fundamentar la aplicación y expansión de estos vehículos y ha proporcionado datos relevantes no solo de su preparación, sino de su desempeño y su potencial. Además, esta variabilidad de enfoques tiene explicación por la extraordinaria interdisciplinariedad que posee el campo de la nanomedicina, donde se entrecruzan conocimientos de ramas como la química, la biología, la física, la ingeniería y la farmacia, entre otras. La fragmentación disciplinaria puede resultar en investigaciones específicas que profundizan significativamente en un ámbito específico, pero que difícilmente podrían abarcar completamente el ciclo de vida, desde los descubrimientos de los fenómenos biológicos hasta la fabricación a escala industrial para su aplicación clínica. Todas y cada una de estas posibles áreas de investigación son indispensables para lograr un verdadero avance clínico.

Partiendo de esta base multidisciplinaria es crucial señalar que, sin una adecuada vehiculización y capacidad de producción industrial, es posible que muchas alternativas terapéuticas vean retrasada su traslación clínica, postergando así su relevancia a nivel epidemiológico. Un ejemplo de esta afirmación la constituyen las vacunas de mRNA, que hoy en día están revolucionando la medicina y el manejo epidemiológico. La teoría alrededor de la utilidad biológica de las mismas tiene décadas (329,349). Sin embargo, el éxito que hoy podemos afirmar que este tipo de herramientas poseen se debe, en gran medida, al desarrollo de los vehículos lipídicos que permiten su adecuada protección, distribución, aplicación, distribución y direccionamiento (320,583). Fundamentalmente, son vehículos que permiten el cumplimiento de su acción

terapéutica, pero también son vehículos que han logrado ser producidos en masa para su distribución. Por lo tanto, es un aporte valioso que este tipo de investigaciones contemplen desde su concepción no solo el éxito biológico y farmacológico, sino también el éxito galénico, incluyendo la manufacturabilidad y escalabilidad.

En este panorama, la presente investigación se distingue por su enfoque galénico, estableciendo su diseño experimental desde una perspectiva orientada hacia la industrialización y a facilitar el cumplimiento de las guías de desarrollo de medicamentos. Con la incorporación de los principios de QbD, se buscó mejorar la eficiencia y la eficacia de las formulaciones desarrolladas, además de buscar establecer un marco replicable y adaptable para futuras investigaciones. Al aplicar un abordaje alineado con las recomendaciones regulatorias, esta investigación pretende crear un puente entre la investigación académica y la práctica clínica, lo cual es crucial para el avance de la nanomedicina. Además, se espera que estos esfuerzos conduzcan a tratamientos más seguros y efectivos para enfermedades del SNC y potencialmente para otros campos.

Esta integración con el concepto de QbD ha servido como un eje central en este estudio, que estructuró no solo el objetivo de desarrollar una formulación óptima, sino también la búsqueda de un entendimiento profundo del proceso general de fabricación y funcionalización de nanopartículas lipídicas por mezcla microfluídica bajo la influencia de variables críticas; con el objetivo más amplio de generar mayor grado de conocimiento que enriquecieran el acervo científico de la especialidad.

El potencial de impacto de este enfoque fue objeto de discusión en una de las publicaciones que forma parte de los aportes académicos de esta investigación. En esta se argumentó que: “(...) *las exploraciones más amplias de espacios del diseño conducirán a una mayor comprensión de la fabricación de nanopartículas mediante mezcla microfluídica. El tiempo y el coste de los desarrollos de nanopartículas lipídicas deberían reducirse como consecuencia del crecimiento del conocimiento basado en más variables y más niveles de interacción, aumentando la traslación clínica de los desarrollos de nanopartículas lipídicas*” (128).

A lo largo de este capítulo se discutirá detalladamente cómo los hallazgos descritos en la sección de resultados ofrecen perspectivas valiosas no solo para la robustez de la formulación desarrollada, sino también para el campo más amplio de la manufactura y funcionalización de nanopartículas lipídicas.

5.2 El proceso de preformulación

El proceso de preformulación es fundamental para asegurar que las nanopartículas desarrolladas estén encaminadas hacia el éxito tanto terapéutico como galénico. La integración del enfoque QbD en esta etapa permitió no solo definir las características del producto, sino también asegurarse que las exploraciones ampliarían el entendimiento de cómo las variaciones en los procesos de fabricación pueden influir en estas.

En el proceso de definición activa y sistemática del QTPP, se documentó cuáles son las diferentes características que debe cumplir el medicamento para asegurar la efectividad y seguridad del producto final. Fundamentado en el objetivo principal de obtener una formulación capaz de transportar eficazmente siRNA a través de la BHE, la definición del QTPP partió primordialmente de buscar la protección del material genético y la facilitación del direccionamiento activo, a la vez de obtener una formulación estable. De manera inicial este análisis se hizo a la luz de la experiencia previa del grupo de investigación.

Durante más de una década, el trabajo del grupo de investigación ha evolucionado desde la exploración para el desarrollo de nanopartículas de quitosano (584,585) hacia el desarrollo de nanopartículas lipídicas, más específicamente con el desarrollo de SLNs catiónicas para su uso como vectores no virales para el desarrollo de terapias génicas (586–589). Más recientemente se ha estudiado su proceso de liofilización desde una perspectiva de estandarización y optimización de parámetros (539). En estas formulaciones previas, el RNA o DNA se incorpora a la nanopartícula después de su fabricación, mediante interacción electrostática entre la carga positiva en la superficie de las nanopartículas, y la carga negativa del siRNA a pH fisiológico, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura. En este abordaje, por lo tanto, los nucleótidos se sitúan en la superficie de la nanopartícula. Los estudios realizados por el grupo de investigación han confirmado la aptitud de estas formulaciones como sistemas de vehiculización altamente eficientes y no tóxicos, con un alto potencial terapéutico (584–589).

Sin embargo, algunos autores han cuestionado este enfoque de sistemas de entrega en que el material está expuesto en la superficie de la nanopartícula y señalan la necesidad de avanzar hacia sistemas más avanzados que encapsulen el material genético en el interior de su estructura y puedan brindar más control de la cinética de liberación (590,591) a la vez que puede facilitar la modificación adicional de las nanopartículas para facilitar su direccionamiento (491,592,593). Esto es particularmente importante en la administración intravenosa, donde la presencia de nucleasas de la sangre podría significar la degradación del RNA/DNA.

A la luz de este conocimiento, resultó evidente que para avanzar hacia los objetivos terapéuticos propuestos era necesario emplear un tipo de vehículo distinto respecto al que se venía trabajando en el grupo en los últimos años. De esa manera se realizó la transición hacia el tipo de vehículo lipídico de núcleo electrodenso, específicamente hacia el tipo de nanopartícula identificada como LNPs, compuestas en este caso por lípidos catiónicos o ionizables, y que en el campo de la vehiculización de ácidos nucleicos también se les puede referir como simplemente nanopartículas lipídicas (340). Esta selección se debe a su capacidad de proteger el material encapsulado. Además, en lugar de utilizar los pasos post-manufactura para acomplejar el siRNA, como se hacía anteriormente en el grupo de investigación, el vehículo seleccionado permite utilizar el espacio de esos pasos adicionales para realizar las reacciones de funcionalización, que se discutirán más adelante en este documento.

El cambio en el tipo de nanopartícula requirió también implementar una nueva metodología de fabricación. Basados también en el estado del arte en la fabricación de este tipo de vehículos se seleccionó el método de inyección de etanol (339). Aunque el cambio representó un desafío, dado que había que iniciar el desarrollo con el proceso de aprendizaje respectivo, también alineó la investigación con otro de los objetivos críticos del proyecto: realizar la fabricación con un método apto y adaptable para el escalamiento y producción a escala industrial.

Mientras que el método de fabricación de homogenización en caliente era laborioso, riesgoso para el material termosensible y difícilmente escalable, la inyección de etanol es un método más simple, rápido, reproducible y escalable, particularmente debido a su adaptación la fabricación mediante técnicas de mezcla microfluídica (339). Este método se adoptó después de una serie de pruebas que culminaron con un proceso de adquisición de un nuevo equipo de mezcla microfluídica asistida por presión, y su puesta en marcha en paralelo al establecimiento de esta investigación. Cabe mencionar, que como inconveniente, este método conlleva la introducción de solventes orgánicos que deben ser posteriormente eliminados del medio.

De esta manera tanto el vehículo como el método de fabricación se seleccionaron priorizando la protección del material genético y la facilidad para el direccionamiento específico hacia el SNC, a la vez que también buscó que fueran luego aplicables a un contexto de fabricación a gran escala, ayudando así al cumplimiento tanto de los objetivos terapéuticos y galénicos del proyecto.

La revisión bibliográfica que perfiló el tipo de vehículo y el método de manufactura también permitió establecer una composición estándar de la formulación de las nanopartículas. Basándose en el análisis de estudios preexistentes, se definió una fórmula que incluye un lípido ionizable o catiónico, un fosfolípido como lípido auxiliar, un lípido pegilado y colesterol. En particular, se seleccionó Dlin-MC3-DMA y DSPC como lípido ionizable y fosfolípido respectivamente, debido a su amplia documentación y éxito tanto en aplicaciones preclínicas como clínicas (418–422). Concretamente, el Dlin-MC3-DMA es importante para la formación de la partícula, en la carga y la liberación del siRNA, y en la captación por parte de las células. El colesterol brinda soporte estructural y aumenta la biocompatibilidad. El lípido pegilado contribuye a la estabilidad y prolonga la vida media en sangre, mientras que el DSPC mejora la estabilidad y la capacidad de fusión con membranas plasmáticas (595).

La elección de esta formulación base posee una probada compatibilidad con el siRNA y una estudiada influencia sobre su estabilidad y eficiencia de encapsulación. Además, su seguridad y aplicabilidad clínica han sido comprobadas por estudios clínicos que llevaron a la aprobación del Onpatro® (Patisiran), el primer medicamento basado en terapias de silenciamiento génico que es comercializado (501,598). Esta composición base también se ha adoptado para la preparación de formulaciones de edición génica basadas en CRISPR-Cas9, como Casgevy® y otros desarrollos que actualmente se encuentran en fases de estudios clínicos (599–603). Optar por esta composición establecida minimiza la incertidumbre en torno a los efectos de la composición y, por lo tanto, reduce el nivel de riesgo asociado a los parámetros de formulación.

Con la claridad de haber definido el vehículo y método de fabricación, y con objetivos de aplicación establecidos desde el inicio, se contó con una base para poder abordar la definición del QTPP de forma sistemática. El establecimiento documentado y sistemático de este QTPP permitió identificar los CQA y con ellos proceder al análisis de riesgo, y ambos de forma combinada se convirtieron en una guía estratégica en el proceso de desarrollo. De esa manera se buscó que cada decisión que se tomó en el proceso estuviera alineada con que el producto final cumpla con los objetivos deseados.

Este proceso de definición progresivo del QTPP, los CQA, y el análisis de riesgo para esos CQA en función de los CPP se basó en una combinación de revisión exhaustiva de la bibliografía, la experiencia del grupo de investigación en el desarrollo de medicamentos, así como en los estándares generales aplicados a la vía de administración seleccionada. Dado que la selección y justificación de cada elemento de esta estructura se encuentra ampliamente detallada desde Tabla 18 hasta la Tabla 35, los detalles específicos detrás de estas definiciones no se discutirán en esta sección. Sin embargo, es importante recalcar que estas definiciones fueron directamente influenciadas por los objetivos terapéuticos de la investigación, así como por las necesidades intrínsecas de las oportunidades de administración a través de la BHE.

Este proceso enfrentó un desafío fundamental debido al carácter emergente del campo del desarrollo de nanopartículas, especialmente con el enfoque galénico de esta investigación. La base de conocimiento, el nivel de seguridad en el establecimiento de CQA y sus relaciones con CPP no gozan del conocimiento extenso que puede observarse, por ejemplo, en formas

farmacéuticas convencionales que se fabrican a escala industrial desde hace décadas, y cuyos desarrollos se han abordado desde la QbD desde los orígenes de esta filosofía de desarrollo. Así, existen aún oportunidades de generar conocimiento en este campo. Aunque desde la perspectiva académica esta situación representa una oportunidad valiosa para contribuir al crecimiento del conocimiento general del campo, también representa desafíos prácticos debido a la falta de estándares en el área. Desde la perspectiva del análisis de riesgos, esta incertidumbre aumenta el nivel de riesgo, y esto se refleja en la preponderancia de riesgo que se observa en la Tabla 19 y la Tabla 29, con una cantidad relativamente baja de CPP con un impacto de riesgo bajo en los CQA respectivos. En esta investigación se prefirió una estrategia conservadora, preferiblemente sobrestimando los riesgos, para evitar que un enfoque demasiado laxo pudiera omitir elementos cruciales del diseño y análisis, asegurando así que se realizara un escrutinio exhaustivo de todos los aspectos potencialmente críticos.

De esta manera el análisis de riesgo se convirtió en la guía que estructuró el proceso de desarrollo, la selección del diseño experimental y la elección de las técnicas analíticas. Se priorizó la exploración exhaustiva de los parámetros que se establecieron con un riesgo alto para CQA específicos. A su vez, en análisis de riesgo también guió la selección de métodos analíticos hacia el control de los CQA priorizados según el riesgo. La anticipación de los riesgos permitió también establecer estrategias de control para, sino entender los mecanismos que los causan, al menos minimizar su impacto potencial.

Sin embargo, este tipo de procesos no resultan infalibles y están sujetos a errores, ya sea por omisión o subestimación de riesgos. Aunque la esterilidad se introdujo como un objetivo de calidad durante la evaluación del QTTP, no se incluyó ningún parámetro de proceso asociado con este atributo durante el análisis de riesgo. A nivel interno se asumió que la esterilidad se aseguraría mediante la filtración esterilizante aplicada justo antes de la administración, tratándolo como parte de la preparación de la muestra más que como un paso del proceso de manufactura. Por ende, no se evaluó el impacto de esta variable, y ni mucho menos se controló. Los riesgos no evaluados no se manifestaron propiamente en el atributo de esterilidad (del que se había asumido idoneidad), sino el impacto de otro atributo también identificado: la detectabilidad de los materiales. Esta circunstancia ilustra la importancia de tomar las decisiones a la luz de un enfoque sistemático. La decisión de no incluir la filtración no fue una decisión que no fuera pensada, sino que se sustentó de manera muy general y simplificada, sin incluirla en el análisis sistemático. Por este motivo, no se evaluó a la luz de los diferentes atributos. Si se hubiese analizado a la luz del atributo de identificación, se podría haber anticipado debido a la experiencia y por lo tanto abordado con pruebas de compatibilidad. Esta omisión resultó en los problemas señalados en la sección 4.3.6.2, y que de cierta manera condicionaron la interpretación de resultados de biodistribución, cuya discusión se abordará más adelante en la sección 5.5.

Los riesgos que no se documentan y analizan sistemáticamente pueden manifestarse en otras etapas del ciclo de vida del medicamento. En este caso particular, al identificar estos riesgos durante las fases iniciales preclínicas, es posible ajustar y planificar experimentos futuros acorde a estos nuevos hallazgos. Las etapas siguientes de la investigación, que se extienden más allá de esta tesis doctoral, se fundamentarán en las observaciones realizadas y conducirán al desarrollo de experimentos adicionales. Estas etapas también tomarán en cuenta una reclasificación de los riesgos iniciales en función de los resultados obtenidos.

El enfoque de preformulación adoptado facilitó la monitorización y control de los atributos críticos de calidad (CQA) y los parámetros críticos de proceso (CPP), alineándose con

regulaciones internacionales y favoreciendo la escalabilidad y comercialización. La preformulación de forma sistemática y bien documentada, debería convertirse en una práctica más habitual en la investigación de nanopartículas para reforzar la reproducibilidad y la eficiencia de los estudios de desarrollo farmacéutico.

A su vez, permitió generar una base sobre la que estudios similares pueden realizar una estimación de riesgos y de relevancia de parámetros distinta, sustentada sobre las observaciones particulares de esta investigación. También planteó una base adicional de preguntas de investigación abriendo camino para la expansión de esta línea de estudio por parte del grupo de investigación, lo que enriquecerá la producción académica y acumulación de conocimiento teórico en la fabricación de nanopartículas para el direccionamiento activo de terapias.

5.3 Formulación de las nanopartículas lipídicas

En esta fase de la investigación se exploró el impacto de las variaciones en los parámetros de formulación y los CPP sobre los CQA de las nanopartículas, centrando la atención en las combinaciones de mayor riesgo identificadas previamente. Aquellos CPP que no fueron evaluados en distintos niveles, se establecieron como valores fijos controlados, definiendo así los límites dentro de los cuales se llevaron a cabo las pruebas experimentales. Esta estrategia permitió delimitar el espacio del diseño y facilitar la optimización del diseño final. El enfoque metodológico empleado no solo mostró los efectos individuales de cada parámetro, sino que también permitió un nivel de análisis más profundo, revelando interacciones críticas y desafiando las concepciones previamente aceptadas en el campo.

En este contexto se generó la publicación del artículo *“Dialysis is a key factor modulating interactions between critical process parameters during the microfluidic preparation of lipid nanoparticles”* publicado en la revista *Colloid and Interface Science Communications* (factor de impacto de 4,7) volumen 54, mayo 2023, 100709 (128). Los resultados mostrados en este artículo se encuentran también reportados en las secciones 4.1.2 y 4.1.3. La decisión de publicar estos resultados se basó en la naturaleza innovadora y desafiante de las conclusiones obtenidas. Estas indican que la diálisis, paso normalmente poco estudiado y al que se le da poca importancia, es un parámetro crucial que afecta fuertemente el tamaño de partícula y el potencial zeta, y afecta moderadamente el PDI. Adicionalmente, se presenta que este altera la influencia de otros CPP y que particularmente reduce la relevancia del impacto del FRR, un parámetro que tradicionalmente se considera crítico en el desarrollo de nanopartículas. Como la diálisis es un parámetro crucial por su propio impacto y la modulación de otros CPP, se sugiere que debe ser considerado una parte integrada del método de manufactura de nanopartículas por mezcla microfluídica en vez de ser considerado como un paso extra.

Esta observación sobre la relevancia relativa del FRR representa un desafío significativo para el estado actual de la fabricación de nanopartículas mediante mezcla microfluídica, dado que el FRR es uno de los dos CPP más ampliamente enfatizados en la literatura. Los resultados mostrados en la Figura 39 (panel izquierdo) ilustran el enfoque tradicional, que no incorpora la diálisis como parte del espacio del diseño explorado y en el que ciertamente el tamaño de partícula corresponde a una interrelación de valores de TF y de FRR. Sin embargo, la observación del panel derecho de la misma figura, contemplando el efecto de la diálisis, muestra que a ciertos valores de TF, el tamaño de la partícula se mantiene relativamente constante dependiendo del FRR empleado.

Este hallazgo sugiere que, en futuras investigaciones que establezcan su estrategia experimental en las observaciones contempladas en esta tesis o en el artículo publicado como parte de ella, y donde la diálisis esté integrada al proceso, se podría reducir la cantidad de experimentaciones necesarias. Esto podría no solo optimizar el proceso de desarrollo, sino impactar en el consumo de recursos, siempre y cuando sean casos donde amerite esa integración del proceso de purificación.

La necesidad de aplicar la purificación depende del objetivo de aplicación biológica de las LNP, ya que el etanol remanente del proceso de mezcla microfluídica representará una incompatibilidad con la administración a cultivos celulares o en animales de experimentación. A pesar de su relevancia, la literatura sugiere una subestimación de este proceso en el desarrollo de LNPs mediante QbD, como muestra la figura 1 del referido artículo y que se encuentra en el Anexo 2-1. Eso quiere decir que, si se siguiera esta tendencia de no considerar la diálisis como un CPP, las evaluaciones relacionadas con la incorporación de este proceso de purificación se realizarían en etapas posteriores del proceso de formulación, cuando ya se ha realizado los experimentos de optimización del tamaño en función del TF y FRR. Aunque esto podría parecer razonable dada esa limitada atención como CPP hacia el proceso de purificación, los resultados obtenidos en esta investigación señalan que esa inclusión tardía podría estar ignorando sectores relevantes del espacio del diseño. En tal caso, el perfil de calidad de las LNPs resultaría más del azar que de un conocimiento detallado de cómo los CPP afectan a los CQA. Por lo tanto, excluir el efecto de la diálisis en el diseño del espacio de exploración podría considerarse un enfoque de calidad por prueba.

La diálisis debería incluirse en el proceso de formulación desde las etapas iniciales, incluso si las aplicaciones biológicas se postergan hasta etapas posteriores del desarrollo, ya que cualquier entendimiento del proceso fruto de las exploraciones del espacio del diseño realizadas sin la diálisis, podrían volverse irrelevantes cuando este proceso se agregue como un paso adicional. La relevancia de este proceso se confirma además con los experimentos adicionales llevados a cabo en términos de composición de la solución de diálisis expuestos en la Figura 35 y la Figura 47.

El posible impacto de la diálisis es en tamaño de las LNPs se relaciona con el fenómeno de la maduración de Ostwald (319,604). Las nanopartículas experimentan este mecanismo cuando las partículas más pequeñas se fusionan después del procedimiento de mezcla rápida. La presencia de etanol disminuye la estabilidad de la membrana lipídica, facilitando la fusión de nanopartículas y, por lo tanto, un alto tamaño de partícula cuando no se realiza la diálisis. Además, el cambio del medio por uno que contiene un contenido iónico más alto aumentará la repulsión electrostática entre las LNPs, reduciendo la posibilidad de fusión de partículas, según la teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek sobre la estabilidad de dispersiones coloidales hidrofóbicas (605).

Los hallazgos alrededor de la optimización del proceso de fabricación de la presente tesis no se limitan a los resultados incluidos en esta publicación relacionadas con el efecto del TF, FRR y la diálisis en el tamaño de partícula, PDI y potencial zeta. La investigación también se extendió al entendimiento de otras variables, como la composición de la fase lipídica y las soluciones también empleadas en estos atributos de calidad, además de incluir estudios sobre el contenido de siRNA y la eficiencia de encapsulación (EE). En conjunto, estos hallazgos ilustran la complejidad del diseño de nanopartículas y la necesidad de un control preciso de los parámetros de formulación.

Por ejemplo, se encontró que las nanopartículas fabricadas con concentraciones más altas de lípidos (25 mM de lípidos totales, comparados con 2,5 mM) muestran tamaños de partícula inferiores, posiblemente fruto de una saturación más rápida al momento de la mezcla microfluídica. También, se notó que el uso del lípido ionizable Dlin-MC3-DMA resultaba partículas más grandes en comparación con el uso del lípido catiónico DOTAP, posiblemente por una mayor repulsión electrostática de las nanopartículas con el uso de este último. Las diferencias en el potencial zeta entre ambos lípidos, ilustradas en la Figura 44, y reforzadas por el análisis de componentes principales presentado en el Anexo 1, Figura A 1, refuerzan la hipótesis de que la diferencia en tamaño se debe principalmente a diferencias en el potencial zeta. El mecanismo que explica este efecto es un posible cambio en el patrón de aglomeración/repulsión de las nanopartículas. Por otra parte, los resultados de efectos en los CQA obtenidos del DoE de formulación muestran que variaciones en el contenido de DSPC y de lípido ionizable causan efectos significativos en las características de las nanopartículas, lo que corresponde a una validación de la elección de la composición basada en la revisión bibliográfica discutida en la sección anterior.

De forma contrastante, los estudios realizados sobre la EE proporcionaron una visión diferente respecto al impacto de los CPP evaluados. Por un lado, se demostró que ni la composición de la fase lipídica, ni los valores de TF ni de FRR tienen un efecto significativo en la EE cuando ese parámetro se calcula según la fórmula convencional descrita en la Ecuación 1. Por otra parte, un análisis más crítico y profundo de los datos recabados sugieren la necesidad de revisar tanto esa evaluación inicial del impacto de CPP, como la propia metodología de cálculo. En realidad, los resultados en términos de contenido absoluto de RNA podrían indicar que esta fórmula podría no ser la más apropiada para reflejar la verdadera capacidad de estos vehículos para acomplejar y encapsular el RNA durante la fabricación.

De acuerdo con lo habitualmente aplicado para este cálculo, la EE hace referencia al porcentaje de RNA encapsulado como porcentaje total del RNA presente en la suspensión completa a un tiempo dado. Sin embargo, esta cantidad total puede no reflejar adecuadamente la capacidad del lípido ionizable y, por ende, de la nanopartícula, para captar el RNA presente en la fase acuosa. Es posible que cualquier RNA que permanezca fuera de la nanopartícula sufra degradación, lo que podría reducir tanto la cantidad no encapsulada como la cantidad total. Esto ofrece una explicación sólida para los valores particularmente altos de EE reportados tanto en nuestras determinaciones como en muchas publicaciones. A lo largo de esta investigación, se detectó esta discrepancia, la cual coincidentemente viene a ser apoyada con un estudio recientemente publicado en enero de este año en la revista *Nature Scientific Reports* (606). En efecto, los valores de EE que se obtuvieron en este estudio obtenidos cuando se empleó la cantidad absoluta de RNA cuantificado y la cantidad teórica ajustada por dilución en la fabricación, que se encuentran alrededor de un 57%, son congruentes por lo reportado por los autores de dicho artículo, donde se sugiere una definición de la EE más ajustada a la realidad, denominada EE_{input} . Esta aproximación también explica la variabilidad observada en términos de contenido total que se observa en la Figura 51 y en la Figura 52.

A pesar de estas consideraciones, los resultados claramente ilustran que el vehículo es una plataforma robusta, capaz de encapsular más del 50% del RNA agregado a la formulación, independientemente de variaciones en la configuración del proceso y la composición de la fórmula. Esta observación es relevante para el diseño de procesos de fabricación en que se busca la reproducibilidad y la eficiencia sin comprometer la calidad del material agregado.

Otro tema relevante es que la diálisis redujo la cantidad absoluta de RNA encapsulado. Los efectos (o el no efecto) en la EE es irrelevante a la luz de las observaciones anteriormente discutidas. Esta reducción causada por la diálisis se observa en aproximadamente la misma proporción aún en formulaciones con distinto contenido total de RNA, como se ve en la Figura 52, lo que sugiere que este fenómeno no está asociado al nivel de carga de la nanopartícula. Esta reducción en el contenido indica que el proceso de diálisis no es completamente inocua para la calidad de la nanopartícula. Este hallazgo subraya la necesidad de estudiar más en profundidad la optimización de las condiciones de diálisis, con el fin de minimizar la pérdida de la carga sin comprometer la eficacia del proceso de purificación.

Por último, los resultados de la prueba de estabilidad muestran que el vehículo es capaz de mantener la integridad del RNA durante al menos tres semanas, a una temperatura de 4 °C. Durante ese período, la protección que se obtiene a esa temperatura es comparable a la que se observa a -20 °C. Esto resalta la eficacia del vehículo en proteger el RNA porque normalmente, en solución acuosa, se esperaría una diferencia significativa en la estabilidad del RNA en estas dos condiciones de temperatura. Además, esta estabilidad demuestra que la pérdida de material (material no encapsulado) que se observa cuando se calcula la EE_{input} no se debe a una falla del vehículo lipídico en proteger el material, sino que sugiere que puede deberse a una dificultad para captar el RNA durante la fabricación. Este último fenómeno subraya la necesidad de más investigaciones, ya que la propuesta de un enfoque disruptivo en el cálculo de la EE abre la posibilidad de cuestionar las conclusiones previamente establecidas en el estado del arte.

Más allá de los resultados en cuanto a contenido de RNA, los resultados de estabilidad relacionados con el tamaño de partícula y PDI corroboran también que la temperatura de 4 °C es adecuada para mantener estos CQA dentro de los límites establecidos, mientras que a -20 °C resulta inadecuada debido a la aglomeración irreversible observada. Aunque este período de tres semanas no es apto para el almacenamiento a largo plazo requerido para aplicaciones clínicas, sí ofrece un margen suficiente para realizar fabricaciones destinadas a ensayos preclínicos dentro de ese plazo. En caso de que se confirme el potencial clínico, se debe avanzar en estudios de liofilización² para superar los desafíos de aglomeración en condiciones no controladas de congelación/descongelación. Posteriormente, se deberán llevar a cabo estudios de estabilidad más completos y exhaustivos para validar plazos de almacenamiento más prolongados.

La culminación de esta fase de desarrollo de las nanopartículas base ha servido para destacar la relevancia de las condiciones de proceso y desafiar algunas nociones establecidas en el estado del arte de la fabricación de nanopartículas por mezcla microfluídica. Este análisis ha facilitado la optimización del proceso de manufactura y ha sentado una base sólida para futuros estudios

² Se realizaron pruebas preliminares de liofilización empleando sacarosa y trehalosa como crioprotectores en concentraciones al 2, 5 y 10%. Como condiciones del proceso de liofilización se emplearon las condiciones detalladas en una publicación previa del grupo de investigación (360). La publicación mencionada se enfoca en la estabilidad coloidal del SLNs sometidas a liofilización, y las condiciones de proceso reproducidas en esta tesis corresponden a las condiciones que se obtuvieron fruto de la optimización de proceso descrita en dicha publicación. Los resultados más prometedores se obtuvieron utilizando trehalosa al 10%. Aunque alentadores, estos resultados mostraron un aumento del tamaño de partícula promedio del 16%, debido en parte a la aparición de una segunda población de nanopartículas de más de una micra de diámetro promedio. Por lo tanto, será necesario realizar estudios adicionales para optimizar la resuspensión de las nanopartículas y minimizar las alteraciones de su tamaño.

de funcionalización, manteniendo un enfoque crítico y constructivo sobre el conocimiento general de los procesos implicados.

5.4 Funcionalización de las nanopartículas lipídicas

En el área multidisciplinar de la utilización de nanopartículas para el desarrollo de terapias, el direccionamiento activo se presenta como un reto crucial para desbloquear el potencial de controlar la biodistribución de forma precisa y dirigir las nanopartículas hacia células o tejidos diana (430,431,435). La modificación de la superficie de las nanopartículas con estructuras que faciliten su acumulación y reconocimiento de acuerdo con las características fisiológicas, anatómicas o patológicas específicas ofrece la posibilidad de diseñar terapias personalizadas. Este enfoque refleja el antiguo concepto ideado también por el científico Paul Erlich sobre la “bala mágica”, un sistema terapéutico capaz de actuar de forma selectiva sobre el blanco deseado, sin causar efectos en tejidos sanos (607–609). A pesar de su prometedor potencial, solo unas pocas estrategias de direccionamiento activo en nanopartículas han avanzado hacia fases de estudios clínicos (221,222), señalando un camino aún por recorrer para su implementación clínica efectiva.

El área de la aplicación en el direccionamiento activo de terapias que más volumen de producción académica acumula es la aplicación en el campo de la oncología (610–615), posiblemente motivado tanto por la relevancia epidemiológica de este espectro de enfermedades, como por los conocidos y severos efectos adversos fruto de su acumulación fuera del tejido tumoral. El direccionamiento activo también ha emergido como una estrategia prometedora y ampliamente estudiada para superar la BHE. Para esta aplicación particular, se emplean ligandos con afinidad específica a moléculas exclusivamente presentes o sobreexpresadas en la BHE, aprovechando los mecanismos de transporte intrínsecos implicados en la dinámica de tráfico habitual del cerebro (36,111,616).

Sin embargo, uno de los retos más importantes que enfrenta el desarrollo de nanoterapias para el direccionamiento activo a través de la BHE es la selección del ligando adecuado para la modificación de las nanopartículas. Este reto se debe en parte a la dificultad de comparar estudios, en los que a menudo intervienen diversas variables, y a que muchas de las revisiones bibliográficas que se encuentran en la literatura tienden a centrarse en enumerar y explicar los diferentes enfoques, más que en un análisis comparativo de los resultados o en una discusión en profundidad de los aspectos específicos de los estudios (36,125,126,617). Estos trabajos representan un valioso aporte para fundamentar el empleo de diferentes estrategias, pero la falta de un enfoque comparativo revela que, a nivel práctico, existía una oportunidad para realizar una exhaustiva revisión para proporcionar información sobre qué estrategias han mostrado los resultados más prometedores dentro de sus respectivos diseños experimentales, ofreciendo así una indicación del éxito relativo de cada enfoque. Durante las fases iniciales de esta investigación se detectó esta oportunidad, y se aprovechó para realizar dicho trabajo exhaustivo que culminó con el trabajo académico: *“The piper at the gates of brain: A systematic review of surface modification strategies on lipid nanoparticles to overcome the Blood-Brain-Barrier”* publicado en la revista *International Journal of Pharmaceutics* (factor de impacto de 5,3), volumen 665, septiembre 2024, 124686 (321).

Como se puede consultar en los detalles de la publicación, esta revisión sistemática cuantitativa sintetizó los resultados de 80 estudios, obtenidos a partir de 2041 artículos identificados, y permitió extraer conclusiones generales respecto a las estrategias de funcionalización y su impacto en la permeabilidad hacia la BHE. Fundamentalmente se analizaron estudios que

emplearan una estrategia de evaluación, ya sea *in vitro*, *in vivo*, o ambas, y que de sus resultados se pudiera establecer una proporción de aumento de la permeabilidad base, permitiendo así un análisis multivariado basado en las características de cada formulación.

De manera descriptiva, se observó que la modificación con péptidos es la más común de las estrategias ejecutadas (Anexo 2-3, figura 2) y que las evaluaciones *in vivo* fueron las que tuvieron mayor grado de aplicación (Anexo 2-3, figura 3); entre otras observaciones relevantes. El análisis integrado entre los diferentes estudios reveló una correlación entre una mayor mejora de la permeabilidad debido al tipo y tamaño de la nanopartícula, así como de la categoría de funcionalización (Anexo 2-3, figura 7; y Anexo 2-4, Figuras S-4, S-6 y S-7). Particularmente, las estrategias que mostraron mejoras más marcadas en la permeabilidad fueron aquellas donde se emplearon NLCs o sistemas biomiméticos, en estudios con tamaños de partículas menores a 150 nm³, y aquellos que empleaban estrategias de funcionalización mixtas.

En cuanto a nuestro conocimiento, esta revisión es única en la literatura, ya que no solo ofrece herramientas que pueden orientar la selección de ligandos específicos, sino que también ofrece una visión sobre la importancia de adoptar protocolos estandarizados en los procesos de desarrollo y evaluación de nanopartículas funcionalizadas para cruzar la BHE. En ella se resalta la complejidad y la heterogeneidad en las metodologías de evaluación y la selección de estrategias de control. Por lo tanto, se discute cómo la adopción de prácticas estandarizadas puede mejorar la comparabilidad y, por lo tanto, facilitar la identificación de futuras direcciones de investigación en el desarrollo de sistemas más efectivos de LNPs para la entrega de fármacos al SNC.

La publicación de esta revisión no solo ha enriquecido el panorama actual en el desarrollo de terapias de direccionamiento activo a través de la BHE, sino que también fue fundamental para guiar algunas decisiones claves tomadas durante la presente tesis doctoral. Por ejemplo, influyó en la selección de los péptidos como estrategia de funcionalización, y particularmente la guio hacia algunos de los péptidos con mayor aplicación en el campo, como los dirigidos hacia el receptor de transferrina (THRre) y hacia el LRP1 (Angiopep 2) (Anexo 2-3, figura 2 y tabla 1). Además, también se incluye el diseño experimental el péptido RVG. Además de estar presente en algunos de los estudios contemplados en la revisión sistemática (Anexo 2-3, tabla 1), fue elegido también por su papel en la infección del SNC por parte del virus de la rabia. Como se abordará al final de la discusión, esto es un ejemplo de cómo la naturaleza puede inspirar la evolución de los desarrollos terapéuticos. Por último, se incluyó también el péptido MiniAp-4. Esta inclusión se dio tanto por influencia del desarrollo y evaluación de péptidos transportadores del grupo del IPBLN-CSIC, dirigido por la Dra. Macarena Sánchez Navarro y con el cuál colaboramos, como por su carácter novedoso. Si bien es cierto que este péptido ya ha demostrado su aptitud como agente para facilitar el cruce a través de la BHE (473,618,619), hasta la fecha de redacción de este documento no se han reportado estudios que lo utilicen para funcionalizar nanopartículas, lo que se alinea con el enfoque innovador mantenido en esta investigación.

Sin embargo, los péptidos por si solos no son suficientes para lograr la funcionalización de las nanopartículas. En el caso de la formulación abordada en esta investigación, otro componente clave para la funcionalización fue el lípido que incluyera la maleimida. A partir de tres diferentes

³ Este hallazgo refuerza la decisión tomada durante la definición del QTPP perfil de calidad, donde se estableció el objetivo de obtener nanopartículas con tamaños menores a 100 nm. Esta característica está alineada con las estrategias que han mostrado mayor potencial para mejoras en permeabilidad a la BHE, según las conclusiones de la revisión sistemática.

excipientes disponibles, la inclusión de la maleimida no se concibió con un simple agregado al sistema. Este cambio se abordó desde una perspectiva galénica rigurosa, guiada por QbD, con el objetivo de asegurar no solo el agregado del lípido funcional a la preparación, sino la disponibilidad funcional en la superficie de la nanopartícula.

Abordar la funcionalización desde un proceso parametrizado y optimizable implicó determinar cuánta maleimida se “queda” en el sobrenadante luego de la mezcla microfluídica, la cual se pierde en los procesos de purificación; cuánta queda encapsulada dentro de la nanopartícula, la cual no está disponible para el acople de péptidos post-manufactura; y más relevante, cuánta queda efectivamente expuesta en la superficie de las nanopartículas, disponible para lograr su funcionalización. Para ello se requirió de desarrollar un enfoque analítico que no solo consiste en la aplicación de la técnica de cuantificación, sino también en cuanto al manejo y tratamiento de las muestras, permitiendo discernir la localización específica dentro de la formulación. De acuerdo con lo descrito en metodología y resultados de esta tesis, fue posible “seccionar” analíticamente hablando la suspensión de nanopartículas obtenida y, por ende, extraer conclusiones adicionales de comportamiento de cada lípido funcional de forma diferenciada.

La implementación de uno o varios métodos analíticos apropiados fue clave para poder avanzar hacia esa localización. Aunque los primeros intentos para establecer una técnica confiable enfrentaron desafíos que constituyeron un retraso para la investigación, la búsqueda de alternativas llevó a la configuración de un método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-UV). Este método constituyó un hito para el cumplimiento de objetivos de esta investigación, y estableció un precedente para la cuantificación precisa de componentes. Esta herramienta podrá inspirar futuras investigaciones que realicen un seguimiento más detallado de la incorporación de otros componentes lipídicos, además del lípido maleimida, y ayudar a profundizar en el entendimiento de las dinámicas de interacción entre los materiales y los CPP.

La implementación de este método, en conjunto con el método fluorimétrico para determinar maleimida, llevó a la comprobación de que únicamente una fracción limitada de la maleimida agregada en la formulación está efectivamente disponible para la funcionalización. Este hallazgo subraya la importancia de considerar la maleimida superficial como un atributo CQA de nanopartículas que serán sometidas a funcionalización y de cuantificarlo en cada preparación. Proceder simplemente añadiendo el excipiente y asumir que toda la maleimida está disponible, y a partir de allí hacer los cálculos correspondientes a la funcionalización, corresponde a un error conceptual que no es infrecuente en la literatura. Asumir que la cantidad de maleimida añadida equivale a la cantidad disponible puede conducir a errores en el diseño y manufactura de las nanopartículas. Por una parte, este error tendría implicaciones en término de costos, por el uso ineficiente de materiales por excesos innecesario de agente de funcionalización; mientras que, por otra parte, este error tiene implicaciones en la comprensión y el control de la calidad de la formulación. Un enfoque de ese tipo antagonizaría con los principios de QbD y no permitiría proceder con la selección del lípido maleimida ni su concentración desde la perspectiva de optimización de la respuesta.

Los resultados de esta sección apuntan hacia una necesidad crítica de considerar la estructura química y la composición del lípido en el diseño de nanopartículas para optimizar la presentación de grupos funcionales y maximizar la eficacia terapéutica. Como se detalló en la sección de resultados, la presencia de polietilenglicol (PEG) como enlazador entre la maleimida y el lípido base es fundamental para asegurar una adecuada orientación de la maleimida en la superficie de la nanopartícula. Esto es posiblemente atribuible al carácter hidrófilo del PEG. Este hallazgo permitió preseleccionar el DSPE-mPEG-Mal y el Colesterol-mPEG-Mal como excipientes aptos

para ser incorporados a la formulación, descartando el uso del DSPE-Mal. También se encontró que la fracción de maleimida que se expresa superficialmente no mantiene una correlación lineal con la cantidad agregada a la formulación, sino que existe un umbral de “saturación” en la superficie de las nanopartículas. Para las condiciones de este sistema, se identificó que este umbral se alcanza cuando la concentración de lípido maleimida alcanza el 6%. Estas observaciones orientaron el proceso de selección del excipiente más adecuado, a la concentración óptima para maximizar el CQA de expresión de maleimida superficial con un proceso de incorporación eficiente.

Una vez seleccionados los péptidos para la funcionalización y caracterizada la disponibilidad superficial de maleimida, fue posible avanzar hacia las pruebas de funcionalización propiamente dichas. El impacto de las condiciones de incubación y proporción de péptidos sobre la concentración de final de péptidos y la eficiencia de funcionalización se determinó gracias a la utilización de los dos métodos analíticos HPLC complementarios: uno para medir la cantidad remanente de maleimida y otro para cuantificar directamente los aminoácidos presentes. Además, al disponer de un método de cuantificación de la maleimida superficial, que se aplica antes del proceso de funcionalización, la eficiencia de funcionalización puede calcularse tomando en cuenta la eficiencia real de la reacción misma, sin la interferencia de las pérdidas de maleimida, permitiendo un análisis más preciso y razonado del proceso.

Estas pruebas, realizadas inicialmente con el péptido RVG, demostraron que las condiciones del medio de incubación, más específicamente el pH, tienen un impacto significativo en la capacidad de los péptidos para incorporarse a la superficie de la nanopartícula. Se observó que los resultados a pH de 6,91 y 8,13 mostraron valores bajos de rendimiento de funcionalización, lo cual posiblemente puede deberse a una pérdida de la reactividad por protonación de los grupos tiol, o por la hidrólisis de la maleimida, respectivamente (442,620). Estas diferencias resaltan la importancia de un control estricto en las condiciones de funcionalización asegurar la estabilidad y reactividad de los grupos funcionales.

En cuanto al tiempo de incubación y la proporción de maleimida:péptido se demostró que, aunque el aumento del tiempo y la modificación de las proporciones pueden influir en la eficiencia de funcionalización, se alcanza un punto de saturación donde aumentos adicionales no mejoran significativamente los resultados, específicamente a los 40 minutos empleando una proporción maleimida:péptido de 1:1,25 de proporción. Esto no solo ayuda a establecer parámetros óptimos para la funcionalización, sino que también aporta a la eficiencia costo-efectiva del proceso, al evitar el uso excesivo de reactivos sin un beneficio correspondiente en el rendimiento. Una situación particular se desprende del análisis descrito en el apartado 4.2.2.2.1, cuando se probó el efecto de estos parámetros cuando no se realiza una primera diálisis después de la fabricación y antes de la funcionalización. Un enfoque de este tipo podría resultar beneficioso desde la perspectiva de tiempo de proceso, al eliminarse un paso. También podría considerarse beneficioso para reducir el potencial impacto negativo de la diálisis en el contenido absoluto de RNA o en la reactividad de los grupos funcionales. Sin embargo, en este enfoque se debe gastar una cantidad considerablemente superior de péptido, lo cual debe ser adecuadamente balanceado en el diseño, para considerar en qué punto es preferible priorizar la eficiencia. Estos estudios permitieron establecer parámetros óptimos para la funcionalización y aportar conocimiento sobre la eficiencia costo-efectiva del proceso.

Posteriormente, se validó la eficiencia de funcionalización obtenida empleando diferentes péptidos. A pesar de que la evaluación de las propiedades fisicoquímicas reveló variaciones entre cada péptido, los resultados no discrepan significativamente del ideal buscado para la

vehiculización a través de la BHE, y se muestran consistentes en términos de eficiencia de funcionalización. Estos hallazgos corroboran que, independientemente de las diferencias específicas entre los péptidos, la plataforma desarrollada es robusta y versátil, adecuada para adaptarse a diferentes estructuras peptídicas de funcionalización sin comprometer características fundamentales para la funcionalidad deseada.

El desarrollo y optimización de las estrategias de funcionalización no solo demostraron la viabilidad técnica de la modificación superficial de las nanopartículas, sino también su potencial para ser adaptadas a diferentes péptidos. Los ajustes realizados en la formulación se ejecutaron desde la base del entendimiento y optimización de las condiciones de formulación y operación. Así, se ha logrado comprender de forma detallada el proceso de funcionalización con péptidos en una formulación balse de LNPs, lo que representa un avance hacia el objetivo de vehicular RNA más allá de la BHE.

5.5 Evaluación del desempeño biológico

La inclusión de CQA desde el punto de vista biológico es importante para asegurar la efectividad y seguridad de las nanopartículas desarrolladas. Estos atributos son esenciales para garantizar que una nanopartícula, siendo óptima desde la perspectiva fisicoquímica, también sea viable y efectiva en entornos biológicos reales. Esta inclusión es importante para sistemas de entrega que, además de ser innovadores a nivel técnico, puedan llegar a cumplir su función propósito terapéutica.

Los resultados de las pruebas de citotoxicidad en células HEK 293T respaldan la biocompatibilidad de las nanopartículas desarrolladas. Se determinó un umbral de tolerancia para este modelo celular específico de hasta 30 μ L de la suspensión prototipo, sin inducir cambios morfológicos adversos o signos de muerte celular. Estos datos permiten también definir las condiciones seguras de exposición para futuras pruebas con cultivos celulares.

Interesantemente, la tolerancia observada en este estudio es al menos tres veces superior a la observada con formulaciones previas evaluadas por el grupo de investigación (621).

El estudio de internalización de nanopartículas mediante citometría de flujo sugiere una penetración efectiva y uniforme de las nanopartículas por parte de las células HEK 293T. Este resultado, combinado con la ausencia de citotoxicidad observada, confirma que la biocompatibilidad no se debe a una falta de ingreso de las nanopartículas en las células, sino a la tolerancia del modelo celular al proceso de internalización.

La intensidad de la fluorescencia observada en estos estudios muestra un patrón creciente a mayores volúmenes administrados. Esto sugiere que el mecanismo de entrada no alcanza saturación bajo las condiciones estudiadas, lo cual podría indicar que, bajo las condiciones experimentales actuales, las nanopartículas sin funcionalizar ingresan a las células mediante un mecanismo no específico. Esto abre la puerta a futuras investigaciones para dilucidar los mecanismos de internalización bajo diversas configuraciones de formulación, y para explorar cómo la modificación de las nanopartículas podría afectar la cinética de su internalización.

Complementariamente, los estudios de microscopía confocal permitieron una visualización directa de la distribución de las nanopartículas de células HEK 293T, extendiendo el estudio también a cultivos de hCMEC/D3 y SH-SY5Y. Los cortes confocales observados en células HEK 293T corroboraron los hallazgos obtenidos por citometría de flujo, evidenciando una intensa carga de nanopartículas acumuladas en el citoplasma. Esto demuestra la alta capacidad de las

nanopartículas para penetrar y distribuirse dentro de la célula. A su vez, esto remarca la notable biocompatibilidad incluso ante una relación desproporcionadamente alta de nanopartículas respecto al volumen celular, reforzando la aplicabilidad biológica de las nanopartículas y su potencial de dirigir el fármaco a dianas intracelulares sin comprometer la integridad celular.

No obstante, no se puede dejar de considerar que las células HEK 293T son reconocidas por su alta eficiencia de transfección (622), por lo que se hizo relevante la comparación en modelos celulares más desafiantes, además de más relevantes para los objetivos de direccionamiento de esta investigación. En ese contexto, se incluyeron experimentos en células hCMEC/D3 y SH-SY5Y en los estudios por microscopía confocal. Por un lado, las células hCMEC/D3 son ampliamente utilizadas para modelar la BHE. Exhiben, entre otras características asociadas a CE, una capacidad de captación más restrictiva (567). Por otro lado, las células SH-SY5Y son una línea inmortalizada derivada de un neuroblastoma humano que es ampliamente utilizada en neurociencia por su potencial de diferenciación hacia fenotipos neuronales maduros (564,565). Así, los resultados obtenidos en estas líneas son prometedores ya que se observa que la eficacia de internalización no se limita únicamente a células altamente transfectables, como las HEK 293T, sino también a células que asemejan la funcionalidad de la BHE y a tejidos de naturaleza neuronal. Ambos tipos de células están relacionadas con desafíos primordiales para alcanzar eficacia terapéutica con esta formulación.

Esta integración de los resultados obtenidos de las pruebas de citotoxicidad, citometría de flujo y microscopía confocal proporciona una visión amplia de la biocompatibilidad, la eficiencia de internalización y la distribución intracelular de las nanopartículas. De forma conjunta demuestran la relevancia de estas nanopartículas en contextos que habitualmente representan un desafío significativo para la terapéutica. Esta evidencia destaca el potencial de este desarrollo como una estrategia para dirigir medicamentos más allá de los límites impuestos por la BHE, hacia patologías del SNC.

El siguiente paso en la fase de evaluaciones biológicas abarcó las pruebas de silenciamiento génico. A través de éstas se demostró la protección de la integridad secuencial durante el período de almacenamiento y la capacidad efectiva de liberación en el citoplasma para ejercer su función silenciadora. Durante las fases previas de esta investigación se optó por encapsular tRNA en lugar de siRNA por consideraciones de costo. El uso de tRNA, como un modelo más asequible que la encapsulación de siRNA, es una práctica común en investigaciones similares, y se justifica en las similitudes estructurales entre ambos tipos de RNA, y en su mayor disponibilidad para realizar la puesta a punto del modelo (623–625). Al avanzar hacia las pruebas de silenciamiento se seleccionó el gen TCERG1 como modelo debido a la experiencia previa del grupo, la disponibilidad del siRNA en el laboratorio, así como por el potencial terapéutico debido a su posible papel en trastornos neurológicos (626,627).

Los resultados del *Western blot* evidencian un silenciamiento del gen TCERG1 en las muestras tratadas con las nanopartículas cargadas con siTCERG1. Aunque los resultados de qPCR muestran cierta disparidad con la lipofectamina, confirman la capacidad de las nanopartículas para liberar siRNA y mediar el silenciamiento génico de manera efectiva. La variabilidad observada en estos datos podría atribuirse a una estimación inexacta de la cantidad de siTCERG1 contenido en la nanopartícula. Para refinar futuros resultados en estas pruebas, se recomienda una cuantificación precisa del siRNA de la muestra de evaluación. Estos hallazgos indican que el siRNA se encuentra adecuadamente encapsulado y protegido, liberándose tras su internamiento y actuar de manera eficaz en las células diana.

Sin embargo, para que un vehículo biocompatible, que es capaz de ingresar a las células y ejercer silenciamiento, sea viable para terapias en el SNC, debe demostrar su capacidad para cruzar la BHE. Los estudios biológicos llevados a cabo en este estudio, tanto en modelos celulares como en animales de experimentación, se llevaron a cabo de manera preliminar y exploratoria. Estos estudios sirvieron para evidenciar la aplicabilidad de la formulación para superar esta barrera.

Durante la primera fase, la evaluación en modelos *in vitro*, se obtuvieron resultados que deben interpretarse con precaución debido a problemas de reproducibilidad y control de la permeabilidad. El modelo utilizado consistió en un co-cultivo de células primarias, específicamente células endoteliales derivadas de progenitores de sangre de cordón umbilical y pericitos. La variabilidad intrínseca de estos cultivos primarios podría explicar las dificultades observadas, ya que sus características pueden variar significativamente dependiendo del tejido de origen, las condiciones de extracción y el manejo de las muestras. Al trabajar con este tipo de cultivos existe el riesgo de pérdida de calidad y de que las funciones celulares específicas no reflejen fielmente el comportamiento del modelo original descrito, comprometiendo así la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados (628,629).

Por ello y en los últimos meses de esta investigación, se trabajó en implementar un modelo basado en células hCMEC/D3, ante la necesidad de establecer condiciones de evaluación más controladas que permitan obtener resultados más robustos. Este cultivo corresponde a una línea celular inmortalizada, ampliamente caracterizada y utilizada en estudios de permeabilidad (629). En el futuro, esta línea celular complementará los estudios de vehiculización de las nanopartículas que se están llevando a cabo

Los datos reportados en la Figura 92 corresponden a la única evidencia *in vitro* disponible hasta la fecha para ilustrar el potencial de estas nanopartículas para vehiculizar RNA hacia el SNC. Siempre y cuando se consideren como datos preliminares, y las observaciones tomadas con cautela, estos resultados son esperanzadores al observar el paso de nanopartículas hacia el aceptor del co-cultivo establecido.

Ante estas circunstancias la investigación llegó a un punto donde debía decidirse entre seguir retrasando las evaluaciones *in vivo* hasta que se alcanzara un modelo *in vitro* robusto, o avanzar hacia los modelos animales basados en los resultados preliminares. Aunque los métodos *in vitro* frecuentemente son un requisito para avanzar a ensayos *in vivo* y facilitan la selección de candidatos mediante experimentos de cribado, generalmente son métodos laboriosos y sensibles ante variaciones metodológicas (629–631). Además, la correlación entre los resultados *in vitro* y el comportamiento *in vivo* en el campo de las nanopartículas es, cuando menos, cuestionable. Esta correlación se puede ver comprometida por la ausencia de variables como el metabolismo, la competitividad de los tejidos, de adsorción de proteínas plasmáticas y de la respuesta inmune, entre otros (163,632–634). Este desafío es particularmente significativo en la representación de sistemas más complejos, como es el caso de la BHE. Un ejemplo de ello son los algunos de los hallazgos presentados en la publicación realizada durante esta tesis doctoral “*The piper at the gates of brain: A systematic review of surface modification strategies on lipid nanoparticles to overcome the Blood-Brain-Barrier*”. Entre los estudios incluidos en esta revisión que combinaban estrategias de evaluación tanto *in vitro* como *in vivo*, se observó una correlación limitada ente ambos tipos de estudios (321). Por lo tanto, ante las dificultades técnicas para replicar de manera robusta modelos de BHE, y ante la cuestionable utilidad en términos de predecir el comportamiento *in vivo*, se decidió avanzar de forma paralela hacia estudios *in vivo*.

Esta transición hacia modelos animales se realizó en cumplimiento con los principios bioéticos de bienestar animal. En primer lugar, esta decisión se fundamentó en los resultados preliminares de permeabilidad en el modelo *in vitro* de BHE y en los hallazgos de las pruebas de microscopía confocal en células hCMEC/D3 (Figura 88), que demostraron la capacidad de las nanopartículas para penetrar células que forman parte de la BHE. Además, se justificó también por los antecedentes de bioseguridad de las nanopartículas lipídicas, y por el éxito clínico de la formulación base empleada. En segundo lugar, la transición hacia pruebas *in vivo* se alineó con los principios de 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento) en el uso de animales en experimentación (635,636).

El principio de reemplazo se evidenció en las pruebas en ensayos *in vitro*, que no solo ofrecieron una indicación del potencial para la superar la BHE, sino que también permitieron ajustes críticos en la fórmula. Las primeras pruebas *in vitro* demostraron la necesidad de ajustar la fórmula para agregar el lípido fluorescente (DSPE-MPEG-Cy5) en vez del Nile red. Sin estos ajustes preliminares, la necesidad de cambios solo se habría detectado tras experimentos *in vivo* fallidos, aumentando el número de animales empleado. Por su parte, el principio de reducción se abordó mediante la limitación en el número de péptidos evaluados y la cantidad de individuos por prueba. Aunque esto puede afectar la significancia estadística en los ensayos iniciales, permite afinar los procedimientos experimentales con menos individuos y postergando pruebas en poblaciones mayores hasta tener un conocimiento más profundo y una mayor probabilidad de obtener datos robustos y significativos. Finalmente, el refinamiento de los procedimientos para el manejo de los animales antes, durante y después de las pruebas se orientó hacia la maximización del bienestar animal.

La técnica de imagenología empleada permitió el seguimiento en tiempo real de la distribución de fluorescencia en animales vivos, monitoreando los procesos de acumulación y excreción de las nanopartículas. Este enfoque no solo facilitó la obtención de datos relevantes de la biodistribución, sino que también priorizó el bienestar animal de los individuos. Los estudios más específicos a nivel de tejido se postergaron hacia el final del período de observación establecido después del sacrificio del animal. Independientemente del tipo de muestra, se identificaron dos zonas principales de acumulación: la primera en el abdomen bajo, observada durante las primeras dos horas; y la segunda en la zona media del abdomen, comenzando alrededor de las 6 horas y manteniéndose por el resto del período de observación. Este patrón puede indicar una primera fase de depuración renal, seguida de una fase de hepática. El hecho de que la depuración renal no se mantenga durante todo el período de observación sugiere que existe alguna característica diferencial dentro del grupo de nanopartículas que las segregan y provocan diferencias en la distribución y eliminación, afectando así su vida media.

Una posible explicación para este comportamiento dual es el tamaño de partícula. Se ha demostrado que las partículas más pequeñas tienden a ser eliminadas más fácilmente por la vía renal, y algunos estudios establecen la frontera de tamaño crítico entre los 70 y 100 nm(637–639). Por lo tanto, es posible que el comportamiento observado se deba a que las nanopartículas más pequeñas dentro de la dosis administrada sean excretadas de forma inicial y relativamente rápida por la vía renal, mientras que la más grandes permanecen en circulación y posteriormente son metabolizadas en el hígado y excretadas por el intestino, dando origen a la acumulación observada en la zona media del animal y más evidente a partir de las 6 horas. Esta hipótesis se respalda por las imágenes de microscopía (TEM y AFM) y los datos de distribución de tamaño de partícula (por ejemplo, Figura A 20) que muestran que dentro de los lotes de nanopartículas fabricados hay un porcentaje considerable de nanopartículas con tamaños

inferiores a 50 nm (aproximadamente un 23%), con valores mínimos alrededor de los 20 nm. Además, esta hipótesis se alinea también con lo reportado en la literatura sobre el efecto del tamaño en la biodistribución de nanopartículas (376,640,641), incluyendo evaluaciones que destacan cómo su tamaño influye en la expresión de mRNA y la eficacia del silenciamiento, cuando son sometidas a evaluaciones *in vivo* (642,643).

Estas observaciones tienen implicaciones para la optimización de la biodistribución y el direccionamiento pasivo. Si se busca prolongar la vida media de las formulaciones, se debería considerar aumentar el tamaño de las nanopartículas, mientras que para favorecer la acumulación renal se deberían priorizar tamaños menores. No obstante, es crucial recordar que el tamaño también es un factor determinante para la acumulación en cerebro. De manera que es posible que también existan dos patrones distintos de acumulación en el SNC, uno antes de las dos horas, cuando hay partículas pequeñas en circulación, y otro después cuando predominan las de mayor tamaño.

Esta hipótesis sobre el impacto del tamaño en la cinética de acumulación cerebral debe evaluarse cuidadosamente en estudios futuros. Gracias a los resultados obtenidos en la exploración del espacio del diseño, se sabe que es posible controlar el tamaño de partícula a partir de cambios en el flujo total, como factor más influyente. Esto permite diseñar lotes de nanopartículas con diferentes tamaños y evaluar la distribución en función del tamaño específico y la aplicación deseada.

Las imágenes obtenidas de los animales vivos muestran un panorama general de distribución de las nanopartículas. Sin embargo, la acumulación específica en ciertos tejidos puede ser enmascarada por altas intensidades en sitios de acumulación destacada, como las observadas en vejiga, riñones, hígado y el intestino. Por esta razón, las evaluaciones *ex vivo* se convierten en una herramienta crucial para investigar más a fondo la acumulación en tejidos menos evidentes en la imagen general, en particular en el foco de esta investigación: la búsqueda de acumulación en tejido cerebral.

Evidencia concluyente de la capacidad para sobrepasar la BHE y acumularse en el SNC se obtiene a través de las imágenes de fluorescencia *ex vivo*. Este es un hallazgo fundamental para los objetivos de esta investigación. De esta manera se valida la capacidad de las nanopartículas como vehículos prometedores, y se alinea con los objetivos trazados en el QTPP. Si bien es cierto que la cantidad de muestras en cada experimento es limitada y que resultados puntuales deben interpretarse considerando esta condición, también es crucial reconocer el desafío formidable que representa la BHE para la vehiculización de medicamentos, particularmente de biomoléculas terapéuticas como los RNA. A pesar de la existencia de esta barrera, con esta formulación se observaron señales de acumulación en el tejido cerebral en todos los cerebros analizados, a excepción de uno de los animales, bajo las diferentes condiciones y tiempos descritos en la sección de metodología, específicamente en la Tabla 13.

Los resultados de acumulación en el cerebro⁴, en comparación con los otros órganos analizados, denotan una baja selectividad, con una acumulación preferente hacia el hígado, riñones e intestinos, como se detalla en la Tabla 44 y la Tabla 45. Aunque las nanopartículas demuestran la capacidad de penetrar el SNC, la baja selectividad implica que un porcentaje elevado de la

⁴ La perfusión con PBS 1X realizada antes de extraer los órganos es fundamental para asegurar que la fluorescencia observada se debe a la acumulación de las nanopartículas en el parénquima cerebral, y no meramente en la sangre contenida en los capilares por fuera de la BHE (663).

dosis no alcanza el tejido diana. Esto representa un desafío en términos de eficiencia de la administración. Este aspecto podría ser particularmente problemático si este mismo vehículo se empleara para administrar otros tipos de terapias, especialmente aquellos medicamentos que poseen efectos adversos considerables, como los agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, en terapias tan específicas como el siRNA, donde los efectos adversos se minimizan, esta falta de selectividad podría ser un problema menos grave. Incluso esta modesta distribución en cerebro podría eventualmente ser suficiente para alcanzar un efecto terapéutico. Por lo tanto, los resultados obtenidos de distribución en cerebro representan un avance prometedor, ya que los RNA, de otra forma, enfrentan obstáculos insuperables de cara a acceder al SNC debido a su inestabilidad en plasma y a los mecanismos de la BHE. A pesar de que hay espacio para mejorar la selectividad, estos hallazgos son prometedores y ofrecen una base sólida para futuras optimizaciones.

La extracción de conclusiones más específicas sobre las diferencias entre los grupos administrados enfrenta algunas dificultades. Específicamente, debido a las variaciones involuntarias en las dosis administradas en los diferentes grupos del ensayo realizado con los péptidos RVG, MiniAp-4, y el grupo control con cisteína, tal como se discutió en la sección 5.2. En vista de que la fluorescencia de las soluciones aplicadas no fue la misma, se puede intuir que las cantidades de nanopartículas administradas no fueron las mismas a causa de la posible retención de nanopartículas por los filtros. En ese panorama, la relativización de los datos fue una estrategia clave para poder establecer una base de mejor comparabilidad. Al calcular una magnitud que representa la fluorescencia emitida por cada unidad de fluorescencia administrada, el sesgo de comparación es mejor que si se observaran datos absolutos de emisión.

Esta aproximación, aunque útil, presenta ciertas limitaciones. Por ejemplo, asume que la intensidad observada por la acumulación de nanopartículas sigue un aumento lineal de acuerdo con la dosis administrada, lo cual podría no ser cierto en los rangos de dosis administradas. Se podría argumentar que existe el riesgo de que, a dosis más elevadas, los mecanismos de eliminación o los procesos de traspaso de las barreras se saturen. Incluso es concebible lo contrario, que la permeabilidad de la BHE se vea favorecida a concentraciones más altas desafiando la linealidad. Estos escenarios, aún especulativos, evidencian la necesidad de investigaciones más complejas para entender el comportamiento de estas formulaciones. Por lo tanto, existen dudas razonables de que la normalización de la dosis brinde la oportunidad de comparaciones precisas, ya que no se puede afirmar proporcionalidad en la reducción de la dosis con los valores de acumulación fluorescente observadas. Por lo tanto, para exploraciones futuras se debe mejorar la normalización de las dosis desde su preparación y aplicación, con particular atención a la compatibilidad y no reactividad de los filtros empleados para la filtración esterilizante.

A pesar de las limitaciones metodológicas, es claro que las diferentes estrategias de funcionalización evaluadas mostraron comportamientos diferenciados. Para futuras investigaciones se requiere no solo estandarizar de la dosis, sino también optimizar los tiempos de muestreo. Por ejemplo, en el ensayo 3, los órganos se analizaron al cabo de 6 y 24 horas, pero no se obtuvieron datos sobre la acumulación en cerebro durante lo que se podría considerar la “fase inicial” de distribución. Esta fase inicial puede ser crítica para la acumulación en cerebro, ya que se ha hipotetizado que podría corresponder a la fase de eliminación de nanopartículas más pequeñas. Esta observación sugiere la necesidad de establecer una cinética de acumulación más detallada en cerebro, incluyendo más tiempos de muestreo dentro de las

2 primeras horas. La estrategia de muestrear según la intensidad total, aunque buscó una mayor sensibilidad, podría estar enfocándose en puntos de la curva de distribución más relevantes para la acumulación en órganos de excreción, que en tiempos de más relevantes para la acumulación en el cerebro. Por lo tanto, estos ajustes en la metodología podrían mejorar significativamente la interpretación de los datos y fortalecer las conclusiones sobre el comportamiento biológico de las nanopartículas funcionalizadas, y a partir de allí buscar estrategias para optimizar la respuesta.

Los resultados de la evaluación *in vivo*, aunque preliminares, son fundamentales para delimitar parámetros de seguridad y funcionalidad de las nanopartículas. También han constituido un importante avance para delimitar los protocolos sobre los cuáles continuarán los trabajos del grupo de investigación. A pesar de la limitada cantidad de muestras y su carácter exploratorio, estos datos evidencian la relevancia de las nanopartículas para cruzar la BHE, un resultado valioso, aunque aún exista margen de mejora. La evolución hacia investigaciones más amplias y controladas permitirán expandir los hallazgos preliminares e impulsar la optimización de las formulaciones, alineándolas con los requisitos clínicos y regulatorios.

Esta investigación establece un punto de partida prometedor, demostrando el potencial de la formulación para cumplir con criterios clínicos esenciales y abrir nuevos caminos en la investigación. Además de abordar las diferentes interrogantes generadas en la presente investigación, los siguientes pasos deberán estar centrados en estudios más específicos de interacciones biológicas y el funcionamiento en modelos más complejos de enfermedad. El camino que se ha construido durante este proyecto específico, que es una continuación de los avances generados en el grupo por más de una década, conduce hacia nuevos terrenos en la búsqueda la innovación y la mejora del tratamiento de trastornos neurológicos y psiquiátricos, así como tumores cerebrales, con el potencial de revolucionar el manejo de enfermedades del SNC.

5.6 Direcciones futuras

Como se ha abordado a lo largo de esta discusión, los avances realizados en esta investigación no han estado libres de limitaciones. Muchos de los hallazgos obtenidos, y cada avance realizado, han traído consigo nuevas preguntas y desafíos. Estos desafíos no solo han delimitado el alcance de las conclusiones, sino que han marcado el camino para futuras investigaciones.

Desde el punto de vista galénico, es fundamental revisar y actualizar el QTPP, el análisis de riesgo y los atributos críticos del material. Estas acciones permitirán una mayor alineación con los estándares regulatorios y una mejor comprensión del comportamiento de las nanopartículas en contextos clínicos. También es necesario explorar la escalabilidad del proceso de fabricación mediante mezcla microfluídica, con especial atención en asegurar su aplicabilidad a nivel industrial. Paralelamente, deben optimizarse los métodos de encapsulación de siRNA, enfocándose en un enfoque más preciso para el cálculo de la eficiencia de encapsulación.

Otro aspecto clave será el desarrollo de un proceso de liofilización optimizado para conservar las propiedades de las nanopartículas a largo plazo, imprescindible para avanzar en fases más avanzadas del desarrollo preclínico. Asimismo, será necesario optimizar la purificación mediante diálisis para minimizar la pérdida de siRNA encapsulado.

Desde el punto de vista biológico, se debe continuar con la optimización y evaluación de la funcionalización de las nanopartículas, con énfasis en establecer una curva de dosis-respuesta para los valores de permeabilidad observados. Además, es crucial ampliar la evaluación de la

citotoxicidad, no solo en términos de viabilidad celular, sino también considerando el impacto de las nanopartículas en el metabolismo celular. Es necesario ajustar los protocolos de filtración y administración para asegurar que la adsorción en los filtros no comprometa la dosis administrada.

Avanzar hacia modelos *in vivo* más complejos será prioritario para validar el potencial terapéutico de las nanopartículas funcionalizadas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y estudiar su toxicidad a largo plazo. Será esencial determinar cómo afectan el tamaño y la funcionalización a la distribución y acumulación en el SNC, ajustando estas propiedades para optimizar su especificidad y eficacia terapéutica.

Estos próximos pasos contribuirán a consolidar los avances logrados en esta investigación, Además, se trabajará en la elaboración de publicaciones científicas basadas en los resultados obtenidos en esta tesis, enfocándose inicialmente en los resultados relacionados con la distribución de la maleimida y los efectos de los parámetros de formulación y proceso en su disponibilidad superficial. Asimismo, se revisarán exhaustivamente los resultados restantes para determinar su potencial de publicación, con vistas a realizar pruebas complementarias o aumentar el tamaño de las muestras para fortalecer las conclusiones obtenidas.

En esta sección se especifican áreas prioritarias que se han identificado como posibles ramificaciones de esta investigación, que permitan responder a algunas de las preguntas más relevantes y fortalecer los hallazgos discutidos. Siguiendo estas direcciones se podrían articular nuevas investigaciones para continuar expandiendo el potencial de las nanopartículas y contribuir al avance de la nanomedicina y al tratamiento de enfermedades del SNC, así como su posible aplicación hacia otras aplicaciones terapéuticas.

5.7 Reflexiones finales: una visión personal

La naturaleza ofrece una fuente de inspiración para la síntesis de plataformas más efectivas para la administración de medicamentos. Resulta interesante la posibilidad de establecer un mimetismo entre vehículos como el desarrollado en esta investigación y, en el otro lado, algunas de las estructuras y funciones celulares, así como también con entidades como los virus. Gracias a los avances en la biomedicina, es posible encapsular RNA con objetivos terapéuticos dentro estructuras compuestas por (al menos) colesterol, fosfolípidos, fragmentos de proteínas y estructuras para mejorar la biocompatibilidad; todo esto con el objetivo de proteger y direccionar eficazmente este material. Estas características pueden considerarse como un reflejo artificial de algunas de las funciones intrínsecas de las membranas celulares (644–647) y el reconocimiento de los virus como agentes adaptados para la entrega de material genético a células con una alta especificidad (438,648). Una de las principales tareas de la ciencia en el campo de la nanotecnología, es dotar a estos vehículos artificiales de una interfaz que mejore su compatibilidad con las aplicaciones biológicas. Los esfuerzos para sobrepasar estas y otras dificultades en el desarrollo podrían inspirarse, de manera análoga, en cómo la evolución ha especializado estas estructuras y entidades naturales.

En la evolución de los sistemas biológicos, el éxito y la adaptación no siempre es el resultado de la optimización de cada uno de los rasgos individuales. Las especies no siempre evolucionan hacia un pico de rendimiento absoluto, sino que suele darse una compensación evolutiva (*evolutionary trade-offs*) entre características que en conjunto permiten, quizá no una optimización de cada una de ellas, pero sí una adaptación exitosa al entorno (649–651). Estas compensaciones evolutivas tienen impactos tanto sobre rasgos macroscópicos como sobre mecanismos moleculares. Un particular ejemplo a escala molecular es la relación entre la

velocidad y la fidelidad en el proceso de replicación del DNA (o RNA). Presiones evolutivas generan una compensación o *trade-off* debido a que el aumento en la velocidad de replicación aumenta la tasa de mutaciones en la replicación (652,653). Se ha señalado que esta compensación evolutiva ha tenido particularmente una importancia significativa en la evolución de cierto ARN-virus (653).

Durante el desarrollo de esta tesis el término optimizar ha sido abordado en varias de las secciones, a menudo asociado con “maximizar” una respuesta. Aprendiendo del concepto de compensación evolutiva, también se debe entender que la maximización absoluta de cada característica por separado a menudo no conduce a la máxima eficacia en un sistema complejo. En investigaciones enfocadas en la industrialización, adoptar una visión de eficiencia es crucial. Pero, mientras que es crucial buscar la configuración de excipientes óptima, el proceso de fabricación óptimo y la distribución precisa; también es importante tener en cuenta que, al abordar la respuesta biológica, quizá también se deba considerar que procesos naturales que generan respuestas beneficiosas no siempre representan la configuración “más eficiente”. A veces, estas respuestas simplemente son ventajosas para satisfacer necesidades del organismo o sistema.

Este enfoque sugerido no significa que se deba abandonar la búsqueda de optimización en la formulación. Más bien, significa que las preguntas que surgen podrían abordarse desde una perspectiva más amplia. Al incursionar en el campo multidisciplinario de la formulación de nanopartículas, un farmacéutico galénico debe volverse también un poco biólogo, químico, físico, e ingeniero (como mínimo), e incorporar esos conocimientos en los mecanismos de desarrollo para la obtención de formulaciones robustas, reproducibles, escalables, costo-eficientes y compatibles con las regulaciones, que cumplan su función biológica priorizando beneficios específicos y entendiendo sus efectos multidimensionales. El enfoque de QbD y el uso específico del DoE proporcionan una base sólida para adquirir y modelar matemáticamente ese conocimiento con la configuración experimental más eficiente mientras se busca la mayor recolección de variables relevantes.

Esta inspiración en la naturaleza y enfoque multidisciplinario es el que se sugiere para abordar los desafíos planteados por esta investigación, y la articulación de nuevas investigaciones que construyan sobre los hallazgos obtenidos en este proyecto. Desde su carácter preliminar, destacamos que esta tesis proporciona valiosas perspectivas sobre el diseño y la optimización de nanopartículas lipídicas para la entrega de siRNA a través de la BHE. Los hallazgos subrayan la importancia de un enfoque científico riguroso en el desarrollo de nanopartículas, fundamentado en los principios de calidad por diseño (QbD), y la necesidad de mantener un enfoque holístico en el diseño de formulaciones críticas para el éxito de terapias basadas en nanopartículas.

Fundamentalmente, esta formulación demostró traspasar una barrera importante para el desarrollo de terapias para el SNC, estableciendo un precedente para futuras investigaciones que busquen optimizar y aplicar estas estrategias en contextos clínicos específicos. En cada objetivo, el proceso no solo se limitó al objetivo directo, sino a una búsqueda amplia del entendimiento y la mejora continua de los procesos de desarrollo y evaluación. La culminación de este proceso de desarrollo no solo motiva la continuación de la investigación centrada en esta formulación específica, sino que también invita a un aprendizaje más profundo en el campo, que en algunos casos desafía, y que siempre fortalece, el estado del arte en la fabricación microfluídica de medicamentos.

Si las observaciones prácticas son útiles para futuras formulaciones y si las preguntas de investigación planteadas fortalecen el estado del arte o generan investigación relevante, entonces esta investigación habrá acercado un paso más (o que al menos lo haya acercado 72,79 nanómetros), hacia la traslación clínica de terapias de silenciamiento génico dirigidas al sistema nervioso central, (un “chorrito” microfluídico a la vez) más allá del complicado, pero necesario, obstáculo que representa la barrera hematoencefálica.

6 Conclusiones

Con la ejecución de la metodología descrita, y un análisis exhaustivo de los datos obtenidos, se han formulado varias conclusiones relacionadas con el desarrollo, caracterización y eficacia de las nanopartículas lipídicas funcionalizadas para la vehiculización de siRNA a través de la BHE. A continuación, se detallan las principales conclusiones que sustentan el potencial del vehículo desarrollado.

- 6.1 A través de un proceso guiado por nociones de QbD se realizó el desarrollo de una formulación de nanopartículas lipídicas utilizando la técnica de mezcla microfluídica. La formulación específica incluye: DLin-MC3-DMA al 40%, DSPC al 10%, DSPE-mPEG-2000 al 1,5%, DSPE-mPEG-2000-Cy5 al 1,5%, DSPE-mPEG-2000-MAL, y Colesterol al 41%. La fabricación se realizó en un chip microfluídico con un flujo total de 3000 mL/min y un FRR de 3, seguido de purificación con PBS 1X. Esta formulación optimizó los valores de CQA en relación con el QTPP establecido, por lo tanto, obteniéndose un vehículo con potencial para aplicaciones terapéuticas e industriales.
- 6.2 La incorporación del enfoque de QbD al desarrollo de nanopartículas lipídicas permitió la exploración sistemática del espacio del diseño para optimizar la formulación y preparación de nanopartículas lipídicas. Además de sentar las bases para un proceso de desarrollo alineado con estándares regulatorios y de escalabilidad industrial, permitió articular el desarrollo del diseño experimental que trajo consigo observaciones relevantes para desafiar algunos elementos del estado del arte de manufactura microfluídica de nanopartículas, particularmente:
 - La diálisis, normalmente considerada como un paso secundario de la formulación, es un CPP que afecta significativamente el tamaño de partícula, el potencial zeta y el PDI, además de afectar la forma en la que el FRR afecta estos mismos parámetros. La inclusión de la diálisis, o cualquier otro proceso de purificación, como parte del diseño del proceso es esencial para garantizar una optimización integral del espacio del diseño
- 6.3 El planteamiento experimental permitió la identificación del impacto de los CPP en los CQA de las nanopartículas lipídicas delineando las correlaciones claves para este sistema específico. Los principales efectos determinados son:
 - El aumento del flujo total provoca una reducción del tamaño de partícula y del potencial zeta, y un aumento del PDI. No posee efectos sobre la eficiencia de encapsulación.
 - Los efectos de FRR, cuando se realiza en conjunto con la diálisis, no posee efecto significativo sobre el tamaño de partícula, provoca un aumento del PDI y una reducción del potencial zeta. No posee efectos sobre la eficiencia de encapsulación.
 - La diálisis provoca una reducción del tamaño de partícula, y un aumento del PDI y del potencial zeta.

- 6.4 Las nanopartículas desarrolladas demostraron una estabilidad adecuada para avanzar hacia evaluaciones preclínicas, manteniendo sus características fisicoquímicas dentro de un rango estrecho durante un periodo de al menos 3 semanas a 4 °C. Los resultados observados en esta condición en cuanto a protección de RNA son comparables a los observados con la congelación, condición en la que se observó una agregación irreversible a cualquier tiempo. Las condiciones a temperatura ambiente generaron una pérdida del contenido de RNA y un aumento del tamaño de partícula desde la semana 1 de almacenamiento.
- 6.5 La técnica de HPLC-UV puede aplicarse para la identificación y cuantificación de los componentes lipídicos empleados para fabricar las nanopartículas lipídicas. Esta técnica, relativamente más accesible en muchos laboratorios de investigación, permite un análisis de cómo las diferentes condiciones de formulación y fabricación afectan la distribución de los componentes dentro de las nanopartículas. Con la aplicación de diseños experimentales es posible evaluar la incorporación de los lípidos maleimida en la formulación de las nanopartículas:
- Únicamente entre el 49,06 y el 76,80% de la maleimida agregada a las soluciones lipídicas se expresa en la superficie de las nanopartículas cuando se utiliza DSPE-mPEG-Mal o Colesterol-mPEG-Mal. El resto del lípido se distribuye o al interior de la nanopartícula, o queda en el líquido sobrenadante tras la preparación.
 - El porcentaje de la maleimida agregada que se expresa superficialmente tiende a disminuir conforme se aumenta su proporción en la fórmula. Particularmente, valores por encima del 6% del lípido maleimida parecen no tener utilidad práctica en aumentar la cantidad disponible para funcionalización.
 - La presencia del enlazador de polietilenglicol en los lípidos maleimida es esencial para aumentar la expresión superficial de maleimida, habiéndose observado porcentajes superiores para el DSPE-mPEG-Mal y Colesterol-mPEG-Mal, en comparación con el DSPE - Mal.
- 6.6 La incorporación de grupos maleimida permitió la funcionalización con diferentes péptidos de direccionamiento, alcanzando más del 80% de eficiencia de funcionalización, calculada en función de la maleimida disponible en la superficie. Para esta incorporación, las nanopartículas purificadas fueron incubadas en PBS 1X (pH 7,4) con una cantidad de péptido 1,25 veces mayor, en proporción molar, a la maleimida superficial disponible. La funcionalización completa se alcanzó tras 40 minutos con agitación constante y protección de la luz, con un proceso de purificación final con PBS 1X.
- 6.7 La formulación desarrollada mostró biocompatibilidad y capacidad de penetración celular que demuestra su aptitud para aplicaciones biológicas. Específicamente:
- Se observó ausencia de efectos adversos observables sobre la viabilidad de cultivos celulares de HEK 293T hasta valores umbrales de exposición por encima de la experiencia previa del grupo de investigación con SLN.

- La formulación mostró, dentro del umbral de tolerancia, la capacidad de penetrar efectivamente tanto hacia células HEK 293T, como hacia tipos celulares relacionados con la baja permeabilidad de la BHE y de células de naturaleza neuronal, como lo son los cultivos de hCMEC/D3 y SH-SY5Y.
- 6.8 Las nanopartículas desarrolladas demostraron ser aptas para el desarrollo de terapias de silenciamiento génico, como se evidenció en los estudios *in vitro* dirigidos al silenciamiento del gen TCERG1. Esto demuestra que junto con la capacidad de encapsular y mantener la concentración de siRNA, estas nanopartículas protegen la secuencia preservando su integridad. Asimismo, se demuestra que, además de ingresar a las células, el vehículo es capaz de liberar el siRNA en el citoplasma, permitiendo que ejerza su efecto silenciador de manera efectiva.
- 6.9 La formulación desarrollada demostró ser segura y biocompatible en estudios *in vivo*, sin mostrar signos de toxicidad aguda en los animales de experimentación. Los análisis de imagenología revelaron un patrón de acumulación que sugiere una primera fase de eliminación vía renal en las primeras dos horas, seguida de una acumulación hepática y excreción por heces a partir de las 6 horas. Este patrón de aclaramiento podría reducir los efectos tóxicos sistémicos reforzando la viabilidad del vehículo para aplicaciones terapéuticas seguras.
- 6.10 Los estudios de biodistribución *in vivo* confirmaron que tanto las nanopartículas funcionalizadas como las no funcionalizadas lograron cruzar la barrera hematoencefálica y acumularse en el cerebro. Este resultado representa un avance crucial en el desarrollo de vehículos eficaces para la entrega de siRNA al sistema nervioso central y abordar unos de los principales desafíos en la administración de terapias basadas en RNA. Las nanopartículas desarrolladas en esta tesis se posicionan como una herramienta prometedora para abordar de forma innovadora y segura trastornos neurológicos, psiquiátricos y de tumores cerebrales.

7 Bibliografía

1. Niven JE, Chittka L. Current Biology Evolving understanding of nervous system evolution. *Current Biology*. 2016;26:R937-41.
2. Proulx ST, Engelhardt B. Central nervous system zoning: How brain barriers establish subdivisions for CNS immune privilege and immune surveillance. *J Intern Med* [Internet]. 1 de julio de 2022 [citado 15 de abril de 2024];292(1):47-67. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/joim.13469>
3. Liebeskind BJ, Hillis DM, Zakon HH, Hofmann HA. Complex Homology and the Evolution of Nervous Systems. *Trends Ecol Evol* [Internet]. 1 de febrero de 2016 [citado 15 de abril de 2024];31(2):127-35. Disponible en: <http://www.cell.com.sire.ub.edu/article/S016953471500302X/fulltext>
4. Damasio A, Carvalho GB. The nature of feelings: evolutionary and neurobiological origins. *Nature Reviews Neuroscience* 2013 14:2 [Internet]. 18 de enero de 2013 [citado 15 de abril de 2024];14(2):143-52. Disponible en: <https://www-nature-com.sire.ub.edu/articles/nrn3403>
5. Hervé PY, Zago L, Petit L, Mazoyer B, Tzourio-Mazoyer N. Revisiting human hemispheric specialization with neuroimaging. *Trends Cogn Sci* [Internet]. 1 de febrero de 2013 [citado 15 de abril de 2024];17(2):69-80. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S1364661312002847/fulltext>
6. Wang D, Buckner RL, Liu H, Wang D. Functional Specialization in the Human Brain Estimated By Intrinsic Hemispheric Interaction. *Journal of Neuroscience* [Internet]. 10 de septiembre de 2014 [citado 15 de abril de 2024];34(37):12341-52. Disponible en: <https://www.jneurosci.org/content/34/37/12341>
7. Verkhatsky A, Nedergaard M. The homeostatic astroglia emerges from evolutionary specialization of neural cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [Internet]. 5 de agosto de 2016 [citado 15 de abril de 2024];371(1700). Disponible en: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2015.0428>
8. Pivoriūnas A, Verkhatsky A. Astrocyte–Endotheliocyte Axis in the Regulation of the Blood–Brain Barrier. *Neurochem Res* [Internet]. 1 de octubre de 2021 [citado 11 de abril de 2024];46(10):2538-50. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11064-021-03338-6>
9. Dunton AD, Göpel T, Ho DH, Burggren W. Form and Function of the Vertebrate and Invertebrate Blood-Brain Barriers. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 12111 [Internet]. 9 de noviembre de 2021 [citado 15 de abril de 2024];22(22):12111. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/22/12111/htm>
10. Segarra M, Aburto MR, Acker-Palmer A, Segarra M, Uni-Frankfurt AP, De (A, et al. Blood–Brain Barrier Dynamics to Maintain Brain Homeostasis. *Trends Neurosci* [Internet]. 1 de mayo de 2021 [citado 16 de abril de 2024];

2024];44(5):393-405. Disponible en:
<http://www.cell.com/article/S0166223620302861/fulltext>

11. Wu D, Chen Q, Chen X, Han F, Chen Z, Wang Y. The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1 [Internet]. 25 de mayo de 2023 [citado 12 de diciembre de 2023];8(1):1-27. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01481-w>
12. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis.* 1 de enero de 2010;37(1):13-25.
13. Dityatev A, Wilson MR, Rusakov D, Menaceur C, Gosselet F, Fenart L, et al. The Blood–Brain Barrier, an Evolving Concept Based on Technological Advances and Cell–Cell Communications. *Cells* 2022, Vol 11, Page 133 [Internet]. 31 de diciembre de 2021 [citado 2 de abril de 2024];11(1):133. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/1/133/htm>
14. Bundgaard M, Abbott NJ. All vertebrates started out with a glial blood-brain barrier 4–500 million years ago. *Glia* [Internet]. 1 de mayo de 2008 [citado 3 de abril de 2024];56(7):699-708. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/glia.20642>
15. O’Brown NM, Pfau SJ, Gu C. Bridging barriers: a comparative look at the blood–brain barrier across organisms. *Genes Dev* [Internet]. 1 de abril de 2018 [citado 3 de abril de 2024];32(7-8):466-78. Disponible en: <http://genesdev.cshlp.org.sire.ub.edu/content/32/7-8/466.full>
16. Laumer CE, Fernández R, Lemer S, Combosch D, Kocot KM, Riesgo A, et al. Form and Function of the Vertebrate and Invertebrate Blood-Brain Barriers. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 12111 [Internet]. 9 de noviembre de 2021 [citado 3 de abril de 2024];22(22):12111. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/22/12111/htm>
17. Verkhratsky A, Parpura V, Li B, Scuderi C. Astrocytes: The Housekeepers and Guardians of the CNS. *Adv Neurobiol* [Internet]. 2021 [citado 11 de abril de 2024];26:21-53. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-77375-5_2
18. Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. The neurovascular unit – concept review. *Acta Physiologica* [Internet]. 1 de abril de 2014 [citado 3 de abril de 2024];210(4):790-8. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/apha.12250>
19. Brüne M, Brüne-Cohrs U. Theory of mind—evolution, ontogeny, brain mechanisms and psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev.* 1 de enero de 2006;30(4):437-55.
20. Redzic Z. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids and Barriers of the CNS* 2011 8:1 [Internet]. 18 de enero de 2011 [citado 16 de abril de 2024];8(1):1-

25. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/2045-8118-8-3>
21. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Artico M. Development of the blood-brain barrier: A historical point of view. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist* [Internet]. 1 de enero de 2006 [citado 1 de abril de 2024];289B(1):3-8. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ar.b.20087>
22. Saunders NR, Dreifuss JJ, Dziegielewska KM, Johansson PA, Habgood MD, Møllgård K, et al. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: A walk through 100 years of history. *Front Neurosci* [Internet]. 16 de diciembre de 2014 [citado 1 de abril de 2024];8(DEC):118844. Disponible en: www.frontiersin.org
23. Davson H. History of the Blood-Brain Barrier Concept. Implications of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation [Internet]. 1989 [citado 1 de abril de 2024];27-52. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0701-3_2
24. Pardridge WM. A Historical Review of Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2022, Vol 14, Page 1283 [Internet]. 16 de junio de 2022 [citado 1 de abril de 2024];14(6):1283. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/6/1283/htm>
25. Villabona-Rueda A, Erice C, Pardo CA, Stins MF. The Evolving Concept of the Blood Brain Barrier (BBB): From a Single Static Barrier to a Heterogeneous and Dynamic Relay Center. *Front Cell Neurosci*. 20 de septiembre de 2019;13:476227.
26. Liddelow SA. Fluids and barriers of the CNS: A historical viewpoint. *Fluids Barriers CNS* [Internet]. 18 de enero de 2011 [citado 2 de abril de 2024];8(1):1-17. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/2045-8118-8-2>
27. Bonetta L. Endothelial tight junctions form the blood–brain barrier. *J Cell Biol* [Internet]. 5 de mayo de 2005 [citado 2 de abril de 2024];169(3):378. Disponible en: <http://pmc/articles/PMC2254792/>
28. Reese TS, Karnovsky MJ. FINE STRUCTURAL LOCALIZATION OF A BLOOD-BRAIN BARRIER TO EXOGENOUS PEROXIDASE. *Journal of Cell Biology* [Internet]. 1 de julio de 1967 [citado 2 de abril de 2024];34(1):207-17. Disponible en: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/34/1/207/1620280/207.pdf>
29. DEMPSEY EW, WISLOCKI GB. AN ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER IN THE RAT, EMPLOYING SILVER NITRATE AS A VITAL STAIN. *J Biophys Biochem Cytol* [Internet]. 25 de mayo de 1955 [citado 2 de abril de 2024];1(3):245-56. Disponible en: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/1/3/245/1456280/245.pdf>
30. VAN BREEMEN VL, CLEMENTE CD. SILVER DEPOSITION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND THE HEMATOENCEPHALIC BARRIER STUDIED

- WITH THE ELECTRON MICROSCOPE. *J Biophys Biochem Cytol* [Internet]. 25 de marzo de 1955 [citado 2 de abril de 2024];1(2):161-6. Disponible en: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/1/2/161/1456211/161.pdf>
31. Wang X, Feuerstein GZ, Xu L, Wang H, Schumacher WA, Ogletree ML, et al. ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *J Biophys Biochem Cytol* [Internet]. 25 de septiembre de 1956 [citado 3 de abril de 2024];2(5):531-42. Disponible en: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/2/5/531/1577177/531.pdf>
 32. Brightman MW, Reese TS. JUNCTIONS BETWEEN INTIMATELY APPosed CELL MEMBRANES IN THE VERTEBRATE BRAIN. *Journal of Cell Biology* [Internet]. 1 de marzo de 1969 [citado 3 de abril de 2024];40(3):648-77. Disponible en: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/40/3/648/1621890/648.pdf>
 33. Crone C, Olesen SP. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res*. 3 de junio de 1982;241(1):49-55.
 34. Schaeffer S, Iadecola C. Revisiting the neurovascular unit. *Nature Neuroscience* 2021 24:9 [Internet]. 5 de agosto de 2021 [citado 3 de abril de 2024];24(9):1198-209. Disponible en: <https://www-nature-com.sire.ub.edu/articles/s41593-021-00904-7>
 35. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* [Internet]. 2017 [citado 3 de abril de 2024];96:17-42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>
 36. Mishra A, Kumar R, Mishra J, Dutta K, Ahlawat P, Kumar A, et al. Strategies facilitating the permeation of nanoparticles through blood-brain barrier: An insight towards the development of brain-targeted drug delivery system. *J Drug Deliv Sci Technol*. 1 de septiembre de 2023;86:104694.
 37. Bors LA, Erdö F. Overcoming the Blood–Brain Barrier. Challenges and Tricks for CNS Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica* 2019, Vol 87, Page 6 [Internet]. 28 de febrero de 2019 [citado 13 de diciembre de 2023];87(1):6. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-0532/87/1/6/htm>
 38. Akhtar A, Andleeb A, Waris TS, Bazzar M, Moradi AR, Awan NR, et al. Neurodegenerative diseases and effective drug delivery: A review of challenges and novel therapeutics. *Journal of Controlled Release*. 10 de febrero de 2021;330:1152-67.
 39. Figueroa EG, Caballero-Román A, Ticó JR, Miñarro M, Nardi-Ricart A, González-Candia A. miRNA nanoencapsulation to regulate the programming of the blood-brain barrier permeability by hypoxia. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. 1 de enero de 2022;3:100129.
 40. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases [Internet]. Vol. 1788, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier; 2009 [citado 9 de noviembre de 2020]. p. 842-57. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273608003489#fig1>

41. Guillama Barroso G, Narayan M, Alvarado M, Armendariz I, Bernal J, Carabaza X, et al. Nanocarriers as Potential Drug Delivery Candidates for Overcoming the Blood-Brain Barrier: Challenges and Possibilities. *ACS Omega* [Internet]. 9 de junio de 2020 [citado 13 de diciembre de 2023];5(22):12583-95. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.0c01592>
42. Wanat K. Biological barriers, and the influence of protein binding on the passage of drugs across them. *Molecular Biology Reports* 2020 47:4. 5 de marzo de 2020;47(4):3221-31.
43. Pandit R, Chen L, Götz J. The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 1 de enero de 2020;165-166:1-14.
44. Tosi G, Duskey JT, Kreuter J. Nanoparticles as carriers for drug delivery of macromolecules across the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Deliv*. 2019;17(1):23-32.
45. Ding S, Khan AI, Cai X, Song Y, Lyu Z, Du D, et al. Overcoming blood–brain barrier transport: Advances in nanoparticle-based drug delivery strategies. *Materials Today*. 2020;37(August):112-25.
46. He Q, Liu J, Liang J, Liu X, Li W, Liu Z, et al. Towards Improvements for Penetrating the Blood–Brain Barrier—Recent Progress from a Material and Pharmaceutical Perspective. *Cells* [Internet]. 23 de marzo de 2018 [citado 9 de noviembre de 2020];7(4):24. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2073-4409/7/4/24>
47. Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. The blood–brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 6 de abril de 2020 [citado 4 de abril de 2024];217(4). Disponible en: <https://doi.org/10.1084/jem.20190062>
48. Lochhead JJ, Yang J, Ronaldson PT, Davis TP. Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Front Physiol* [Internet]. 6 de agosto de 2020 [citado 4 de abril de 2024];11:558491. Disponible en: www.frontiersin.org
49. Harilal S, Jose J, Parambi DGT, Kumar R, Unnikrishnan MK, Uddin MS, et al. Revisiting the blood-brain barrier: A hard nut to crack in the transportation of drug molecules. *Brain Res Bull*. 1 de julio de 2020;160:121-40.
50. Zhao Y, Gan L, Ren L, Lin Y, Ma C, Lin X. Factors influencing the blood-brain barrier permeability. *Brain Res* [Internet]. 1 de agosto de 2022 [citado 13 de diciembre de 2023];1788. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35568085/>
51. Medina-Flores F, Hurtado-Alvarado G, Contis-Montes de Oca A, López-Cervantes SP, Königsberg M, Deli MA, et al. Sleep loss disrupts pericyte-

- brain endothelial cell interactions impairing blood-brain barrier function. *Brain Behav Immun*. 1 de octubre de 2020;89:118-32.
52. Bhattacharya A, Kaushik DK, Lozinski BM, Yong VW. Beyond barrier functions: Roles of pericytes in homeostasis and regulation of neuroinflammation. *J Neurosci Res* [Internet]. 1 de diciembre de 2020 [citado 4 de abril de 2024];98(12):2390-405. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jnr.24715>
 53. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, Parpura V, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathologica* 2015 131:3 [Internet]. 15 de diciembre de 2015 [citado 11 de abril de 2024];131(3):323-45. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-015-1513-1>
 54. Verkhratsky A, Pivoriūnas A. Astroglia support, regulate and reinforce brain barriers. *Neurobiol Dis*. 1 de abril de 2023;179:106054.
 55. Heithoff BP, George KK, Phares AN, Zuidhoek IA, Munoz-Ballester C, Robel S. Astrocytes are necessary for blood–brain barrier maintenance in the adult mouse brain. *Glia* [Internet]. 1 de febrero de 2021 [citado 11 de abril de 2024];69(2):436-72. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/glia.23908>
 56. Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood–brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 1987 325:6101 [Internet]. 1987 [citado 11 de abril de 2024];325(6101):253-7. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/325253a0>
 57. Alahmari A. Blood-Brain Barrier Overview: Structural and Functional Correlation. *Neural Plast* [Internet]. 2021 [citado 13 de diciembre de 2023];2021. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34912450/>
 58. Allt G, Lawrenson JG. The blood–nerve barrier: enzymes, transporters and receptors—a comparison with the blood–brain barrier. *Brain Res Bull*. 1 de mayo de 2000;52(1):1-12.
 59. Pintér P, Alpár A. The Role of Extracellular Matrix in Human Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 11085 [Internet]. 21 de septiembre de 2022 [citado 12 de abril de 2024];23(19):11085. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/19/11085/htm>
 60. Thomsen MS, Routhe LJ, Moos T. The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* [Internet]. 1 de octubre de 2017 [citado 12 de abril de 2024];37(10):3300-17. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0271678X17722436>
 61. Knopp RC, Banks WA, Erickson MA. Physical associations of microglia and the vascular blood-brain barrier and their importance in development,

- health, and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 1 de diciembre de 2022;77:102648.
62. Hitze B, Hubold C, van Dyken R, Schlichting K, Lehnert H, Entringer S, et al. How the selfish brain organizes its supply and demand. *Front Neuroenergetics*. 9 de junio de 2010;2(JUN):1706.
 63. Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*. 15 de mayo de 2012;64(7):640-65.
 64. Pifferi F, Laurent B, Plourde M. Lipid Transport and Metabolism at the Blood-Brain Interface: Implications in Health and Disease. *Front Physiol* [Internet]. 30 de marzo de 2021 [citado 17 de abril de 2024];12:645646. Disponible en: www.frontiersin.org
 65. McMullen E, Weiler A, Becker HM, Schirmeier S. Plasticity of Carbohydrate Transport at the Blood-Brain Barrier. *Front Behav Neurosci*. 22 de enero de 2021;14:612430.
 66. Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. Fluid transport in the brain. *Physiol Rev* [Internet]. 1 de abril de 2022 [citado 17 de abril de 2024];102(2):1025-151. Disponible en: <https://journals-physiology-org.sire.ub.edu/doi/10.1152/physrev.00031.2020>
 67. Zaragozá R. Transport of Amino Acids Across the Blood-Brain Barrier. *Front Physiol* [Internet]. 23 de septiembre de 2020 [citado 17 de abril de 2024];11:570922. Disponible en: www.frontiersin.org
 68. Erickson MA, Banks WA. Transcellular routes of blood–brain barrier disruption. *Exp Biol Med* [Internet]. 1 de mayo de 2022 [citado 2 de mayo de 2024];247(9):788-96. Disponible en: <https://journals-sagepub-com.sire.ub.edu/doi/full/10.1177/15353702221080745>
 69. Xie J, Shen Z, Anraku Y, Kataoka K, Chen X. Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies. *Biomaterials*. 1 de diciembre de 2019;224:119491.
 70. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5–deficient mice. *Journal of Cell Biology* [Internet]. 12 de mayo de 2003 [citado 1 de mayo de 2024];161(3):653-60. Disponible en: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200302070>
 71. Villaseñor R, Lampe J, Schwaninger M, Collin L. Intracellular transport and regulation of transcytosis across the blood–brain barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2018 76:6 [Internet]. 6 de diciembre de 2018 [citado 2 de mayo de 2024];76(6):1081-92. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-018-2982-x>
 72. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* [Internet]. 2004 [citado 2 de mayo de 2024];377:159-69.

Disponible en: <http://portlandpress.com/biochemj/article-pdf/377/1/159/712500/bj3770159.pdf>

73. Kucharz K, Kutuzov N, Zhukov O, Mathiesen Janiurek M, Lauritzen M. Shedding Light on the Blood–Brain Barrier Transport with Two-Photon Microscopy In Vivo. *Pharmaceutical Research* 2022 39:7 [Internet]. 16 de mayo de 2022 [citado 2 de mayo de 2024];39(7):1457-68. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-022-03266-2>
74. Ibarra LE. Cellular Trojan horses for delivery of nanomedicines to brain tumors: where do we stand and what is next? <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0034> [Internet]. 26 de febrero de 2021 [citado 6 de mayo de 2024];16(7):517-22. Disponible en: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm-2021-0034>
75. Santiago-Tirado FH, Doering TL. False friends: Phagocytes as Trojan horses in microbial brain infections. *PLoS Pathog* [Internet]. 1 de diciembre de 2017 [citado 6 de mayo de 2024];13(12):e1006680. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006680>
76. Achar A, Myers R, Ghosh C. Drug Delivery Challenges in Brain Disorders across the Blood–Brain Barrier: Novel Methods and Future Considerations for Improved Therapy. *Biomedicines* 2021, Vol 9, Page 1834 [Internet]. 4 de diciembre de 2021 [citado 6 de mayo de 2024];9(12):1834. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/12/1834/htm>
77. Vargas, Ronny; Soley Jordi. Modulación Alostérica Positiva selectiva para el receptor muscarínico M1 : descubrimiento y desarrollo del compuesto VU0486846 y su importancia para el desarrollo terapéutico tratamientos para el Alzheimer y la esquizofrenia Selective Positive Allosteric. *Ars pharmaceutica*. 2021;62(1):90-111.
78. Golde TE. Open questions for Alzheimer’s disease immunotherapy. *Alzheimers Res Ther* [Internet]. 7 de enero de 2014 [citado 10 de mayo de 2024];6(1):1-7. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/alzrt233>
79. Salman MM, Al-Obaidi Z, Kitchen P, Loreto A, Bill RM, Wade-Martins R. Advances in applying computer-aided drug design for neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 1 de mayo de 2021 [citado 10 de mayo de 2024];22(9):4688. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/9/4688/htm>
80. Nance E, Pun SH, Saigal R, Sellers DL. Drug delivery to the central nervous system. *Nature Reviews Materials* 2021 7:4 [Internet]. 3 de diciembre de 2021 [citado 9 de mayo de 2024];7(4):314-31. Disponible en: <https://www-nature-com.sire.ub.edu/articles/s41578-021-00394-w>
81. Wu H, Zhou Y, Wang Y, Tong L, Wang F, Song S, et al. Current State and Future Directions of Intranasal Delivery Route for Central Nervous System Disorders: A Scientometric and Visualization Analysis. *Front Pharmacol*

[Internet]. 12 de julio de 2021 [citado 10 de mayo de 2024];12:717192.
Disponible en: www.frontiersin.org

82. Torrandell-Haro G, Branigan GL, Vitali F, Geifman N, Zissimopoulos JM, Brinton RD. Statin therapy and risk of Alzheimer's and age-related neurodegenerative diseases. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* [Internet]. 1 de enero de 2020 [citado 9 de mayo de 2024];6(1):e12108. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/trc2.12108>
83. Sumien N, Cunningham JT, Davis DL, Engelland R, Fadeyibi O, Farmer GE, et al. Neurodegenerative Disease: Roles for Sex, Hormones, and Oxidative Stress. *Endocrinology* [Internet]. 1 de noviembre de 2021 [citado 9 de mayo de 2024];162(11):1-14. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1210/endo/bqab185>
84. Hansson O. Biomarkers for neurodegenerative diseases. *Nature Medicine* 2021 27:6 [Internet]. 3 de junio de 2021 [citado 9 de mayo de 2024];27(6):954-63. Disponible en: <https://www-nature-com.sire.ub.edu/articles/s41591-021-01382-x>
85. Aldewachi H, Al-Zidan RN, Conner MT, Salman MM. High-Throughput Screening Platforms in the Discovery of Novel Drugs for Neurodegenerative Diseases. *Bioengineering* 2021, Vol 8, Page 30 [Internet]. 23 de febrero de 2021 [citado 10 de mayo de 2024];8(2):30. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2306-5354/8/2/30/htm>
86. Gamarra L, Cláudio L, Pereira R, Silva D, Mamani JB, Bhunia S, et al. Drug Delivery to the Brain: Recent Advances and Unmet Challenges. *Pharmaceutics* 2023, Vol 15, Page 2658 [Internet]. 23 de noviembre de 2023 [citado 10 de mayo de 2024];15(12):2658. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/12/2658/htm>
87. Khatoon R, Alam A, Sharma K. Current approaches and prospective drug targeting to brain. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2020 [citado 19 de noviembre de 2020]; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102098>
88. Nowak M, Helgeson ME, Mitragotri S. Delivery of Nanoparticles and Macromolecules across the Blood–Brain Barrier. *Adv Ther (Weinh)* [Internet]. 2020;3(1):1900073. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/adtp.201900073>
89. Teleanu RI, Preda MD, Niculescu AG, Vladâcenco O, Radu CI, Grumezescu AM, et al. Current Strategies to Enhance Delivery of Drugs across the Blood–Brain Barrier. *Pharmaceutics* 2022, Vol 14, Page 987 [Internet]. 4 de mayo de 2022 [citado 13 de mayo de 2024];14(5):987. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/5/987/htm>
90. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 15 de enero de 1997;23(1-3):3-25.

91. Karami TK, Hailu S, Feng S, Graham R, Gukasyan HJ. Eyes on Lipinski's Rule of Five: A New «Rule of Thumb» for Physicochemical Design Space of Ophthalmic Drugs. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* [Internet]. 1 de enero de 2022 [citado 13 de mayo de 2024];38(1):43-55. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jop.2021.0069>
92. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.* 1 de diciembre de 2004;1(4):337-41.
93. Sethi B, Kumar V, Mahato K, Coulter DW, Mahato RI. Recent advances in drug delivery and targeting to the brain. *Journal of Controlled Release.* 1 de octubre de 2022;350:668-87.
94. Sakiyama H, Fukuda M, Okuno T. Prediction of Blood-Brain Barrier Penetration (BBBP) Based on Molecular Descriptors of the Free-Form and In-Blood-Form Datasets. *Molecules* 2021, Vol 26, Page 7428 [Internet]. 7 de diciembre de 2021 [citado 13 de mayo de 2024];26(24):7428. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/24/7428/htm>
95. Meng F, Xi Y, Huang J, Ayers PW. A curated diverse molecular database of blood-brain barrier permeability with chemical descriptors. *Scientific Data* 2021 8:1 [Internet]. 29 de octubre de 2021 [citado 13 de mayo de 2024];8(1):1-11. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41597-021-01069-5>
96. Masoudi Asil S, Ahlawat J, Guillama Barroso G, Narayan M. Nanomaterial based drug delivery systems for the treatment of neurodegenerative diseases. *Biomater Sci.* 7 de agosto de 2020;8(15):4088-107.
97. Pinkiewicz M, Pinkiewicz M, Walecki J, Zaczynski A, Zawadzki M. Breaking Barriers in Neuro-Oncology: A Scoping Literature Review on Invasive and Non-Invasive Techniques for Blood–Brain Barrier Disruption. *Cancers* 2024, Vol 16, Page 236 [Internet]. 4 de enero de 2024 [citado 13 de mayo de 2024];16(1):236. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/16/1/236/htm>
98. Sharabi S, Last D, Guez D, Daniels D, Hjouj MI, Salomon S, et al. Dynamic effects of point source electroporation on the rat brain tissue. *Bioelectrochemistry.* 1 de octubre de 2014;99:30-9.
99. Giri P, Mittal L, Camarillo IG, Sundararajan R. Analysis of pathways in triple-negative breast cancer cells treated with the combination of electrochemotherapy and cisplatin. *biointerfaceresearch.com* P Giri, L Mittal, IG Camarillo, R Sundararajan *Biointerface Res Appl Chem*, 2021 • *biointerfaceresearch.com* [Internet]. 2021 [citado 13 de mayo de 2024];11(5):13453-64. Disponible en: <https://biointerfaceresearch.com/wp-content/uploads/2021/02/20695837115.1345313464.pdf>
100. Gernert M, Feja M. Bypassing the Blood–Brain Barrier: Direct Intracranial Drug Delivery in Epilepsies. *Pharmaceutics* 2020, Vol 12, Page 1134 [Internet]. 24 de noviembre de 2020 [citado 13 de mayo de 2024];12(11):1134.

- 2024];12(12):1134. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/12/1134/htm>
101. Zha S, Wong KL, All AH. Intranasal Delivery of Functionalized Polymeric Nanomaterials to the Brain. *Adv Healthc Mater* [Internet]. 1 de junio de 2022 [citado 13 de mayo de 2024];11(11):2102610. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adhm.202102610>
 102. Ul Islam S, Shehzad A, Bilal Ahmed M, Lee YS. Intranasal Delivery of Nanoformulations: A Potential Way of Treatment for Neurological Disorders. *Molecules* 2020, Vol 25, Page 1929 [Internet]. 21 de abril de 2020 [citado 13 de mayo de 2024];25(8):1929. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/8/1929/htm>
 103. Fonseca LC, Lopes JA, Vieira J, Viegas C, Oliveira CS, Hartmann RP, et al. Intranasal drug delivery for treatment of Alzheimer's disease. *Drug Deliv Transl Res* [Internet]. 1 de abril de 2021 [citado 13 de mayo de 2024];11(2):411-25. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13346-021-00940-7>
 104. Wen J, Huang Y, Crowe TP, Hsu WH. Evaluation of Recent Intranasal Drug Delivery Systems to the Central Nervous System. *Pharmaceutics* 2022, Vol 14, Page 629 [Internet]. 12 de marzo de 2022 [citado 13 de mayo de 2024];14(3):629. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/3/629/htm>
 105. Fu H, McCarty DM. Crossing the blood–brain-barrier with viral vectors. *Curr Opin Virol*. 1 de diciembre de 2016;21:87-92.
 106. Terstappen GC, Meyer AH, Bell RD, Zhang W. Strategies for delivering therapeutics across the blood–brain barrier. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:5 [Internet]. 1 de marzo de 2021 [citado 23 de mayo de 2024];20(5):362-83. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41573-021-00139-y>
 107. Charabati M, Rabanel JM, Ramassamy C, Prat A. Overcoming the Brain Barriers: From Immune Cells to Nanoparticles. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2020;41(1):42-54. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.11.001>
 108. Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweere S, Pottiez G, Karamanos Y. Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells* 2020, Vol 9, Page 851 [Internet]. 1 de abril de 2020 [citado 14 de mayo de 2024];9(4):851. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/851/htm>
 109. Stanimirovic DB, Sandhu JK, Costain WJ. Emerging Technologies for Delivery of Biotherapeutics and Gene Therapy Across the Blood–Brain Barrier. *BioDrugs* 2018 32:6 [Internet]. 10 de octubre de 2018 [citado 14 de mayo de 2024];32(6):547-59. Disponible en: <https://link-springer-com.sire.ub.edu/article/10.1007/s40259-018-0309-y>

110. Matsumoto J, Stewart T, Banks WA, Zhang J. The Transport Mechanism of Extracellular Vesicles at the Blood-Brain Barrier. *Curr Pharm Des.* 19 de febrero de 2018;23(40):6206-14.
111. Sánchez-Navarro M, Giralt E, Teixidó M. Blood–brain barrier peptide shuttles. *Curr Opin Chem Biol.* 1 de junio de 2017;38:134-40.
112. Virgone-Carlotta A, Dufour E, Bacot S, Ahmadi M, Cornou M, Moni L, et al. New diketopiperazines as vectors for peptide protection and brain delivery: Synthesis and biological evaluation. *J Labelled Comp Radiopharm* [Internet]. 1 de octubre de 2016 [citado 26 de mayo de 2024];59(12):517-30. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jlcr.3442>
113. Fadzen CM, Wolfe JM, Cho CF, Chiocca EA, Lawler SE, Pentelute BL. Perfluoroarene-Based Peptide Macrocycles to Enhance Penetration Across the Blood-Brain Barrier. *J Am Chem Soc* [Internet]. 8 de noviembre de 2017 [citado 26 de mayo de 2024];139(44):15628-31. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jacs.7b09790>
114. Teixidó M, Zurita E, Malakoutikhah M, Tarragó T, Giralt E. Diketopiperazines as a tool for the study of transport across the Blood-Brain Barrier (BBB) and their potential use as BBB-shuttles. *J Am Chem Soc* [Internet]. 26 de septiembre de 2007 [citado 26 de mayo de 2024];129(38):11802-13. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ja073522o>
115. Zuchero YJY, Chen X, Bien-Ly N, Bumbaca D, Tong RK, Gao X, et al. Discovery of Novel Blood-Brain Barrier Targets to Enhance Brain Uptake of Therapeutic Antibodies. *Neuron* [Internet]. 6 de enero de 2016 [citado 26 de mayo de 2024];89(1):70-82. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S0896627315010302/fulltext>
116. Anami Y, Xiong W, Yamaguchi A, Yamazaki CM, Zhang N, An Z, et al. Homogeneous antibody-angiopep 2 conjugates for effective brain targeting. *RSC Adv.* 26 de enero de 2022;12(6):3359-64.
117. Regina A, Demeule M, Tripathy S, Lord-Dufour S, Currie JC, Iddir M, et al. ANG4043, a novel brain-penetrant peptide-mAb conjugate, is efficacious against HER2-positive intracranial tumors in mice. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 1 de enero de 2015 [citado 26 de mayo de 2024];14(1):129-40. Disponible en: [/mct/article/14/1/129/130621/ANG4043-a-Novel-Brain-Penetrant-Peptide-mAb](http://mct/article/14/1/129/130621/ANG4043-a-Novel-Brain-Penetrant-Peptide-mAb)
118. Neves AR, van der Putten L, Queiroz JF, Pinheiro M, Reis S. Transferrin-functionalized lipid nanoparticles for curcumin brain delivery. *J Biotechnol.* 10 de abril de 2021;331:108-17.
119. Pinheiro RGR, Granja A, Loureiro JA, Pereira MC, Pinheiro M, Neves AR, et al. Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 30 de mayo de 2020 [citado 17 de abril de 2023];148(March):105314. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105314>

120. Arora S, Singh J. In vitro and in vivo optimization of liposomal nanoparticles based brain targeted vgf gene therapy. *Int J Pharm.* 25 de octubre de 2021;608.
121. Bi D, Unthan DM, Hu L, Bussmann J, Remaut K, Barz M, et al. Polysarcosine-based lipid formulations for intracranial delivery of mRNA. *Journal of Controlled Release.* 1 de abril de 2023;356:1-13.
122. Zhang W, Liu QY, Haqqani AS, Leclerc S, Liu Z, Fauteux F, et al. Differential expression of receptors mediating receptor-mediated transcytosis (RMT) in brain microvessels, brain parenchyma and peripheral tissues of the mouse and the human. *Fluids Barriers CNS [Internet].* 22 de julio de 2020 [citado 26 de mayo de 2024];17(1):1-17. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12987-020-00209-0>
123. Ferraris C, Cavalli R, Panciani PP, Battaglia L. Overcoming the blood–brain barrier: Successes and challenges in developing nanoparticle-mediated drug delivery systems for the treatment of brain tumours. *Int J Nanomedicine [Internet].* 2020 [citado 14 de diciembre de 2023];15:2999-3022. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=dijn20>
124. Ekhtor C, Qureshi MQ, Zuberi AW, Hussain M, Sangroula N, Yerra S, et al. Advances and Opportunities in Nanoparticle Drug Delivery for Central Nervous System Disorders: A Review of Current Advances. *Cureus [Internet].* 29 de agosto de 2023 [citado 24 de noviembre de 2023];15(8):e44302. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37649926>
125. Correia AC, Monteiro AR, Silva R, Moreira JN, Sousa Lobo JM, Silva AC. Lipid nanoparticles strategies to modify pharmacokinetics of central nervous system targeting drugs: Crossing or circumventing the blood–brain barrier (BBB) to manage neurological disorders. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de octubre de 2022;189.
126. Khare P, Edgecomb SX, Hamadani CM, Tanner EEL, S Manickam D. Lipid nanoparticle-mediated drug delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de junio de 2023;197:114861.
127. Niculescu AG, Chircov C, Bîrcă AC, Grumezescu AM. Nanomaterials Synthesis through Microfluidic Methods: An Updated Overview. *Nanomaterials* 2021, Vol 11, Page 864 [Internet]. 28 de marzo de 2021 [citado 3 de junio de 2024];11(4):864. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/4/864/htm>
128. Vargas R, Romero M, Berasategui T, Narváez-Narváez DA, Ramirez P, Nardi-Ricart A, et al. Dialysis is a key factor modulating interactions between critical process parameters during the microfluidic preparation of lipid nanoparticles. *Colloids and Interface Science Communications [Internet].*

2023;54(March). Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.colcom.2023.100709>

129. Abbott NJ. Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2013 36:3 [Internet]. 23 de abril de 2013 [citado 26 de mayo de 2024];36(3):437-49. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10545-013-9608-0>
130. Morofuji Y, Nakagawa S. Drug Development for Central Nervous System Diseases Using In vitro Blood-brain Barrier Models and Drug Repositioning. *Curr Pharm Des* [Internet]. 24 de febrero de 2020 [citado 27 de mayo de 2024];26(13):1466-85. Disponible en: <https://www.eurekaselect.com/article/104774>
131. Neumaier F, Zlatopolskiy BD, Neumaier B. Drug penetration into the central nervous system: Pharmacokinetic concepts and in vitro model systems. *Pharmaceutics* [Internet]. 1 de octubre de 2021 [citado 27 de mayo de 2024];13(10):1542. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/10/1542/htm>
132. Shukla R, Henkel ND, Alganem K, Hamoud A rizaq, Reigle J, Alnafisah RS, et al. Signature-based approaches for informed drug repurposing: targeting CNS disorders. *Neuropsychopharmacology* 2020 46:1 [Internet]. 30 de junio de 2020 [citado 27 de mayo de 2024];46(1):116-30. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41386-020-0752-6>
133. Hanafy AS, Dietrich D, Fricker G, Lamprecht A. Blood-brain barrier models: Rationale for selection. *Adv Drug Deliv Rev*. 1 de septiembre de 2021;176:113859.
134. Jagtiani E, Yeolekar M, Naik S, Patravale V. In vitro blood brain barrier models: An overview. *Journal of Controlled Release*. 1 de marzo de 2022;343:13-30.
135. Sitia L, Catelani T, Guarnieri D, Pompa PP. In Vitro Blood-Brain Barrier Models for Nanomedicine: Particle-Specific Effects and Methodological Drawbacks. *ACS Appl Bio Mater* [Internet]. 19 de agosto de 2019 [citado 28 de mayo de 2024];2(8):3279-89. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsabm.9b00305>
136. Booth R, Kim H. Permeability Analysis of Neuroactive Drugs Through a Dynamic Microfluidic In Vitro Blood–Brain Barrier Model. *Ann Biomed Eng* [Internet]. 21 de noviembre de 2014 [citado 28 de mayo de 2024];42(12):2379-91. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10439-014-1086-5>
137. Cui B, Cho SW. Blood-brain barrier-on-a-chip for brain disease modeling and drug testing. *BMB Rep* [Internet]. 5 de mayo de 2022 [citado 28 de mayo de 2024];55(5):213. Disponible en: [/pmc/articles/PMC9152581/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/352581/)

138. Kawakita S, Mandal K, Mou L, Mecwan MM, Zhu Y, Li S, et al. Organ-On-A-Chip Models of the Blood–Brain Barrier: Recent Advances and Future Prospects. *Small* [Internet]. 1 de septiembre de 2022 [citado 28 de mayo de 2024];18(39):2201401. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/sml.202201401>
139. Meihua Rose Feng BSP. Assessment of Blood-Brain Barrier Penetration: In Silico, In Vitro and In Vivo. *Curr Drug Metab* [Internet]. 25 de marzo de 2005 [citado 26 de mayo de 2024];3(6):647-57. Disponible en: <https://www-eurekaselect-com.sire.ub.edu/article/9098>
140. Lauschke K, Frederiksen L, Hall VJ. Paving the way toward complex blood-brain barrier models using pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* [Internet]. 15 de junio de 2017 [citado 7 de septiembre de 2024];26(12):857-74. Disponible en: <https://www-liebertpub-com.sire.ub.edu/doi/10.1089/scd.2017.0003>
141. Lippmann ES, Al-Ahmad A, Palecek SP, Shusta E V. Modeling the blood–brain barrier using stem cell sources. *Fluids and Barriers of the CNS* 2013 10:1 [Internet]. 10 de enero de 2013 [citado 28 de mayo de 2024];10(1):1-14. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/2045-8118-10-2>
142. Aday S, Cecchelli R, Hallier-Vanuxeem D, Dehouck MP, Ferreira L. Stem Cell-Based Human Blood-Brain Barrier Models for Drug Discovery and Delivery. *Trends Biotechnol* [Internet]. 1 de mayo de 2016 [citado 28 de mayo de 2024];34(5):382-93. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S0167779916000044/fulltext>
143. Nicolazzo JA, Charman SA, Charman WN. Methods to assess drug permeability across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 18 de febrero de 2010;58(3):281-93.
144. Puscas I, Bernard-Patrzynski F, Jutras M, Lécuyer MA, Bourbonnière L, Prat A, et al. IVIVC Assessment of Two Mouse Brain Endothelial Cell Models for Drug Screening. *Pharmaceutics* 2019, Vol 11, Page 587 [Internet]. 8 de noviembre de 2019 [citado 28 de mayo de 2024];11(11):587. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/11/11/587/htm>
145. Avdeef A. How well can in vitro brain microcapillary endothelial cell models predict rodent in vivo blood–brain barrier permeability? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 14 de junio de 2011;43(3):109-24.
146. Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Müller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, et al. Subcellular Localization of Wild-Type and Parkinson’s Disease-Associated Mutant α -Synuclein in Human and Transgenic Mouse Brain. *Journal of Neuroscience* [Internet]. 1 de septiembre de 2000 [citado 28 de mayo de 2024];20(17):6365-73. Disponible en: <https://www.jneurosci.org/content/20/17/6365>
147. Jucker M, Walker LC, Martin LJ, Kitt CA, Kleinman HK, Ingram DK, et al. Age-associated inclusions in normal and transgenic mouse brain. *Science* (1979)

- [Internet]. 1992 [citado 28 de mayo de 2024];255(5050):1443-5. Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1542796>
148. Quon D, Wang Y, Catalano R, Scardina JM, Murakami K, Cordell B. Formation of β -amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature* 1991 352:6332 [Internet]. 1991 [citado 28 de mayo de 2024];352(6332):239-41. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/352239a0>
 149. Higgins LS, Holtzman DM, Rabin J, Mobley WC, Cordell B. Transgenic mouse brain histopathology resembles early Alzheimer's disease. *Ann Neurol* [Internet]. 1 de mayo de 1994 [citado 28 de mayo de 2024];35(5):598-607. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.410350514>
 150. Li Y, Chen T, Miao X, Yi X, Wang X, Zhao H, et al. Zebrafish: A promising in vivo model for assessing the delivery of natural products, fluorescence dyes and drugs across the blood-brain barrier. *Pharmacol Res.* 1 de noviembre de 2017;125:246-57.
 151. Eliceiri BP, Gonzalez AM, Baird A. Zebrafish Model of the Blood-Brain Barrier: Morphological and Permeability Studies. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2011 [citado 28 de mayo de 2024];686:371-8. Disponible en: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-938-3_18
 152. Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005 4:1 [Internet]. enero de 2005 [citado 28 de mayo de 2024];4(1):35-44. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrd1606>
 153. Washida K, Hattori Y, Ihara M. Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion: From Mouse to Primate. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol 20, Page 6176 [Internet]. 7 de diciembre de 2019 [citado 28 de mayo de 2024];20(24):6176. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/24/6176/htm>
 154. Fontana F, Figueiredo P, Martins JP, Santos HA, Fontana F, Figueiredo P, et al. Requirements for Animal Experiments: Problems and Challenges. *Small* [Internet]. 1 de abril de 2021 [citado 28 de mayo de 2024];17(15):2004182. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/sml.202004182>
 155. Zhao Q, Zhang J, Li H, Li H, Xie F. Models of traumatic brain injury-highlights and drawbacks. *Front Neurol.* 15 de junio de 2023;14:1151660.
 156. Huang HJ, Lee YH, Hsu YH, Liao C Te, Lin YF, Chiu HW. Current Strategies in Assessment of Nanotoxicity: Alternatives to In Vivo Animal Testing. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 4216 [Internet]. 19 de abril de 2021 [citado 28 de mayo de 2024];22(8):4216. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/8/4216/htm>
 157. Prashanth A, Donaghy H, Stoner SP, Hudson AL, Wheeler HR, Diakos CI, et al. Are In Vitro Human Blood–Brain–Tumor–Barriers Suitable Replacements for In Vivo Models of Brain Permeability for Novel

Therapeutics? *Cancers* 2021, Vol 13, Page 955 [Internet]. 25 de febrero de 2021 [citado 28 de mayo de 2024];13(5):955. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/5/955/htm>

158. Mehta P, Soliman A, Rodriguez-Vera L, Schmidt S, Muniz P, Rodriguez M, et al. Interspecies Brain PBPK Modeling Platform to Predict Passive Transport through the Blood–Brain Barrier and Assess Target Site Disposition. *Pharmaceutics* [Internet]. 1 de febrero de 2024 [citado 24 de julio de 2024];16(2):226. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/16/2/226/htm>
159. Zhang W, Liu QY, Haqqani AS, Liu Z, Sodja C, Leclerc S, et al. Differential Expression of ABC Transporter Genes in Brain Vessels vs. Peripheral Tissues and Vessels from Human, Mouse and Rat. *Pharmaceutics* [Internet]. 1 de mayo de 2023 [citado 24 de julio de 2024];15(5):1563. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/5/1563/htm>
160. Syvänen S, Lindhe Ö, Palner M, Kornum BR, Rahman O, Långström B, et al. Species Differences in Blood-Brain Barrier Transport of Three Positron Emission Tomography Radioligands with Emphasis on P-Glycoprotein Transport. *Drug Metabolism and Disposition* [Internet]. 1 de marzo de 2009 [citado 24 de julio de 2024];37(3):635-43. Disponible en: <https://dmd.aspetjournals.org/content/37/3/635>
161. Verscheijden LFM, Koenderink JB, de Wildt SN, Russel FGM. Differences in P-glycoprotein activity in human and rodent blood–brain barrier assessed by mechanistic modelling. *Arch Toxicol* [Internet]. 1 de septiembre de 2021 [citado 24 de julio de 2024];95(9):3015-29. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-021-03115-y>
162. Dao L, You Z, Lu L, Xu T, Sarkar AK, Zhu H, et al. Modeling blood-brain barrier formation and cerebral cavernous malformations in human PSC-derived organoids. *Cell Stem Cell* [Internet]. 6 de junio de 2024 [citado 24 de julio de 2024];31(6):818-833.e11. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S1934590924001462/fulltext>
163. Mármol I, Abizanda-Campo S, Ayuso JM, Ochoa I, Oliván S. Towards Novel Biomimetic In Vitro Models of the Blood–Brain Barrier for Drug Permeability Evaluation. *Bioengineering* 2023, Vol 10, Page 572 [Internet]. 10 de mayo de 2023 [citado 24 de julio de 2024];10(5):572. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2306-5354/10/5/572/htm>
164. Plotkin SR, Banks WA, Maness LM, Kastin AJ. Differential transport of rat and human interleukin-1 α across the blood–brain barrier and blood–testis barrier in rats. *Brain Res.* 20 de octubre de 2000;881(1):57-61.
165. Vargas R, Egurbide-sifre A, Medina L. Organ-on-a-Chip systems for new drugs development. *ADMET DMPK* [Internet]. 2021;9(2):111-41. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35299767/>

166. Mittal R, Woo FW, Castro CS, Cohen MA, Karanxha J, Mittal J, et al. Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8352-80.
167. Zhang B, Korolj A, Lai BFL, Radisic M. Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nat Rev Mater* [Internet]. 2018;3(8):257-78. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41578-018-0034-7>
168. Lee CS, Leong KW. Advances in microphysiological blood-brain barrier (BBB) models towards drug delivery. *Curr Opin Biotechnol*. 1 de diciembre de 2020;66:78-87.
169. Peng B, Hao S, Tong Z, Bai H, Pan S, Lim KL, et al. Blood–brain barrier (BBB)-on-a-chip: a promising breakthrough in brain disease research. *Lab Chip* [Internet]. 27 de septiembre de 2022 [citado 28 de mayo de 2024];22(19):3579-602. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2022/lc/d2lc00305h>
170. Wevers NR, Kasi DG, Gray T, Wilschut KJ, Smith B, Vught R, et al. A perfused human blood-brain barrier on-a-chip for high-throughput assessment of barrier function and antibody transport. *Fluids Barriers CNS* [Internet]. 31 de agosto de 2018 [citado 28 de mayo de 2024];15(1):1-12. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12987-018-0108-3>
171. Santamaria A. Historical Overview of Nanotechnology and Nanotoxicology. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2012 [citado 30 de mayo de 2024];926:1-12. Disponible en: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-002-1_1
172. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* [Internet]. 2020 [citado 30 de mayo de 2024];25(1):112. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3282820/>
173. Xu H, Li S, Liu YS. Nanoparticles in the diagnosis and treatment of vascular aging and related diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1 [Internet]. 11 de julio de 2022 [citado 30 de mayo de 2024];7(1):1-37. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41392-022-01082-z>
174. Baig N, Kammakakam I, Falath W, Kammakakam I. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Mater Adv* [Internet]. 29 de marzo de 2021 [citado 30 de mayo de 2024];2(6):1821-71. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/ma/d0ma00807a>
175. Bhushan B, Bhushan B. Introduction to Nanotechnology: History, Status, and Importance of Nanoscience and Nanotechnology Education. 2016 [citado 30 de mayo de 2024];1-31. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-31833-2_1
176. Löndahl J, Möller W, Pagels JH, Kreyling WG, Swietlicki E, Schmid O. Measurement techniques for respiratory tract deposition of airborne

- nanoparticles: A critical review. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* [Internet]. 1 de agosto de 2014 [citado 30 de mayo de 2024];27(4):229-54. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jamp.2013.1044>
177. Kumar P, Robins A, Vardoulakis S, Britter R. A review of the characteristics of nanoparticles in the urban atmosphere and the prospects for developing regulatory controls. *Atmos Environ*. 1 de diciembre de 2010;44(39):5035-52.
 178. Wang H, Qiao X, Chen J, Wang X, Ding S. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. *Mater Chem Phys*. 15 de diciembre de 2005;94(2-3):449-53.
 179. Koh I, Josephson L. Magnetic Nanoparticle Sensors. *Sensors* 2009, Vol 9, Pages 8130-8145 [Internet]. 16 de octubre de 2009 [citado 30 de mayo de 2024];9(10):8130-45. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8220/9/10/8130/htm>
 180. Chhipa H. Applications of nanotechnology in agriculture. *Methods in Microbiology*. 1 de enero de 2019;46:115-42.
 181. Sircar A, Rayavarapu K, Bist N, Yadav K, Singh S. Applications of nanoparticles in enhanced oil recovery. *Petroleum Research*. 1 de marzo de 2022;7(1):77-90.
 182. Ahmadi MH, Ghazvini M, Nazari MA, Ahmadi MA, Pourfayaz F, Lorenzini G, et al. Renewable energy harvesting with the application of nanotechnology: A review. *Int J Energy Res* [Internet]. 25 de marzo de 2019 [citado 9 de junio de 2024];43(4):1387-410. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/er.4282>
 183. Hussein AK. Applications of nanotechnology in renewable energies—A comprehensive overview and understanding. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 1 de febrero de 2015;42:460-76.
 184. Wong YWH, Yuen CWM, Leung MYS, Ku SKA, Lam HLI. SELECTED APPLICATIONS OF NANOTECHNOLOGY IN TEXTILES. *Autex Research Journal* [Internet]. 1 de marzo de 2006 [citado 9 de junio de 2024];6(1):1-8. Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/aut-2006-060101/html>
 185. Qu X, Alvarez PJJ, Li Q. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water Res*. 1 de agosto de 2013;47(12):3931-46.
 186. Ali Mansoori G, Bastami TR, Ahmadpour A, Eshaghi Z. ENVIRONMENTAL APPLICATION OF NANOTECHNOLOGY. marzo de 2008;439-93.
 187. Rashidi L, Khosravi-Darani K. The Applications of Nanotechnology in Food Industry. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. septiembre de 2011 [citado 9 de junio de 2024];51(8):723-30. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408391003785417>

188. Pacheco-Torgal F, Jalali S. Nanotechnology: Advantages and drawbacks in the field of construction and building materials. *Constr Build Mater*. 1 de febrero de 2011;25(2):582-90.
189. He H, Pham-Huy LA, Dramou P, Xiao D, Zuo P, Pham-Huy C. Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine. *Biomed Res Int* [Internet]. 1 de enero de 2013 [citado 9 de junio de 2024];2013(1):578290. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2013/578290>
190. Haleem A, Javaid M, Singh RP, Rab S, Suman R. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health Journal*. 1 de junio de 2023;7(2):70-7.
191. Chakre M, Sharon M. How Old is Nanotechnology? History of Nanotechnology. 11 de marzo de 2019;1-19.
192. History of Nanotechnology. History of Nanotechnology [Internet]. 11 de marzo de 2019 [citado 30 de mayo de 2024]; Disponible en: <https://onlinelibrary-wiley-com.sire.ub.edu/doi/book/10.1002/9781119460534>
193. Schaming D, Remita H. Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. *Found Chem* [Internet]. 28 de julio de 2015 [citado 30 de mayo de 2024];17(3):187-205. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10698-015-9235-y>
194. Guidetti G, Zanini R, Franceschin G, Moglianetti M, Kim T, Cohan N, et al. Photonic crystals built by time in ancient Roman glass. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 26 de septiembre de 2023 [citado 30 de mayo de 2024];120(39):e2311583120. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2311583120>
195. Feng F, Zhang Y, Zhang X, Mu B, Qu W, Wang P. Natural Nano-Minerals (NNMs): Conception, Classification and Their Biomedical Composites. *ACS Omega* [Internet]. 23 de abril de 2024 [citado 30 de mayo de 2024];9(16):17760-83. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.4c00674>
196. Zobl S, Wilts BD, Salvenmoser W, Pölt P, Gebeshuber IC, Schwerte T. Orientation-Dependent Reflection of Structurally Coloured Butterflies. *Biomimetics* 2020, Vol 5, Page 5 [Internet]. 3 de febrero de 2020 [citado 30 de mayo de 2024];5(1):5. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2313-7673/5/1/5/htm>
197. Kawai H, Motomura T. Structural colour in the brown algal genus *Sporochneus* (Sporochneales, Phaeophyceae). *Eur J Phycol* [Internet]. 4 de mayo de 2024 [citado 30 de mayo de 2024]; Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670262.2024.2340020>
198. Hussain I, Lamiel C, Sahoo S, Javed MS, Ahmad M, Chen X, et al. Animal- and Human-Inspired Nanostructures as Supercapacitor Electrode

- Materials: A Review. *Nano-Micro Letters* 2022 14:1 [Internet]. 6 de octubre de 2022 [citado 30 de mayo de 2024];14(1):1-25. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40820-022-00944-z>
199. Junk A, Riess F. From an idea to a vision: There's plenty of room at the bottom. *Am J Phys* [Internet]. 1 de septiembre de 2006 [citado 30 de mayo de 2024];74(9):825-30. Disponible en: </aapt/ajp/article/74/9/825/1056245/From-an-idea-to-a-vision-There-s-plenty-of-room-at>
 200. Quirk T. There's plenty of room at the bottom. *Australas Biotechnol* [Internet]. 8 de octubre de 2006 [citado 30 de mayo de 2024];16(3):36. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9780429500459-7/plenty-room-bottom-richard-feynman>
 201. Fourkas JT, Gao J, Han Z, Liu H, Marmiroli B, Naughton MJ, et al. Grand Challenges in Nanofabrication: There Remains Plenty of Room at the Bottom. *Frontiers in Nanotechnology*. 7 de octubre de 2021;3:700849.
 202. Apolinário AC, Salata GC, Bianco AFR, Fukumori C, Lopes LB. OPENING THE PANDORA'S BOX OF NANOMEDICINE: THERE IS INDEED 'PLENTY OF ROOM AT THE BOTTOM'. *Quim Nova* [Internet]. 18 de mayo de 2020 [citado 30 de mayo de 2024];43(2):212-25. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/qn/a/6kBXtzscWhJD7Fff57qVkmq/abstract/?lang=en&format=html>
 203. Belete Bahru T, Gebrie Ajebe E, Mohamadpour F. A Review on Nanotechnology: Analytical Techniques Use and Applications. *Int Res J Pure Appl Chem* [Internet]. 3 de agosto de 2019 [citado 2 de junio de 2024];19(4):1-10. Disponible en: <https://journalirjpac.com/index.php/IRJPAC/article/view/407>
 204. Laura Soriano M, Zougagh M, Valcárcel M, Ríos Á. Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where we are and where we are heading. *Talanta*. 15 de enero de 2018;177:104-21.
 205. López-Lorente ÁI, Valcárcel M. The third way in analytical nanoscience and nanotechnology: Involvement of nanotools and nanoanalytes in the same analytical process. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de enero de 2016;75:1-9.
 206. Barenholz Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*. 10 de junio de 2012;160(2):117-34.
 207. Andreopoulou E, Gaiotti D, Kim E, Downey A, Mirchandani D, Hamilton A, et al. Pegylated liposomal doxorubicin HCL (PLD; Caelyx/Doxil®): Experience with long-term maintenance in responding patients with recurrent epithelial ovarian cancer. *Annals of Oncology*. 1 de abril de 2007;18(4):716-21.
 208. Friedrich M, Aigner A. Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives. *BioDrugs* 2022 36:5 [Internet]. 23 de agosto de 2022 [citado 7

de septiembre de 2024];36(5):549-71. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s40259-022-00549-3>

209. Zhang MM, Bahal R, Rasmussen TP, Manautou JE, Zhong X bo. The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochem Pharmacol.* 1 de julio de 2021;189:114432.
210. Philippidis A. CASGEVY Makes History as FDA Approves First CRISPR/Cas9 Genome Edited Therapy. *Hum Gene Ther [Internet]*. 1 de enero de 2024 [citado 7 de septiembre de 2024];35(1-2):1-4. Disponible en:
<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2023.29263.bfs>
211. Kingwell K. First CRISPR therapy seeks landmark approval. *Nat Rev Drug Discov.* 1 de mayo de 2023;22(5):339-41.
212. Wilson B, Geetha KM. Lipid nanoparticles in the development of mRNA vaccines for COVID-19. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1 de agosto de 2022;74:103553.
213. Arcos D. Nanomaterials in Biomedicine 2022. *Int J Mol Sci [Internet]*. 1 de mayo de 2023 [citado 9 de junio de 2024];24(10):9026. Disponible en:
</pmc/articles/PMC10218959/>
214. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* 2018 16:1 [Internet]. 19 de septiembre de 2018 [citado 9 de junio de 2024];16(1):1-33. Disponible en:
<https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-018-0392-8>
215. Nikzamir M, Akbarzadeh A, Panahi Y. An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1 de febrero de 2021;61:102316.
216. Elumalai K, Srinivasan S, Shanmugam A. Review of the efficacy of nanoparticle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Biomedical Technology.* 1 de marzo de 2024;5:109-22.
217. Pradhan D, Biswasroy P, Goyal A, Ghosh G, Rath G. Recent Advancement in Nanotechnology-Based Drug Delivery System Against Viral Infections. *AAPS PharmSciTech [Internet]*. 1 de enero de 2021 [citado 4 de septiembre de 2024];22(1):1-19. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-020-01908-5>
218. Nagati V, Tenugu S, Pasupulati AK. Stability of therapeutic nano-drugs during storage and transportation as well as after ingestion in the human body. *Advances in Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems.* 1 de enero de 2022;83-102.
219. Kirtane AR, Verma M, Karandikar P, Furin J, Langer R, Traverso G. Nanotechnology approaches for global infectious diseases. *Nature Nanotechnology* 2021 16:4 [Internet]. 22 de marzo de 2021 [citado 4 de

septiembre de 2024];16(4):369-84. Disponible en:
<https://www.nature.com/articles/s41565-021-00866-8>

220. Sorolla A, Sorolla MA, Wang E, Ceña V. Peptides, proteins and nanotechnology: a promising synergy for breast cancer targeting and treatment. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 1 de noviembre de 2020 [citado 4 de septiembre de 2024];17(11):1597-613. Disponible en:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17425247.2020.1814733>
221. Taiariol L, Chaix C, Farre C, Moreau E. Click and Bioorthogonal Chemistry: The Future of Active Targeting of Nanoparticles for Nanomedicines? *Chem Rev* [Internet]. 12 de enero de 2022 [citado 4 de septiembre de 2024];122(1):340-84. Disponible en:
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.1c00484>
222. Dutta B, Barick KC, Hassan PA. Recent advances in active targeting of nanomaterials for anticancer drug delivery. *Adv Colloid Interface Sci*. 1 de octubre de 2021;296:102509.
223. Sahu T, Ratre YK, Chauhan S, Bhaskar LVKS, Nair MP, Verma HK. Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. *J Drug Deliv Sci Technol*. 1 de junio de 2021;63:102487.
224. Yusuf A, Almotairy ARZ, Henidi H, Alshehri OY, Aldughaim MS. Nanoparticles as Drug Delivery Systems: A Review of the Implication of Nanoparticles' Physicochemical Properties on Responses in Biological Systems. *Polymers* 2023, Vol 15, Page 1596 [Internet]. 23 de marzo de 2023 [citado 4 de septiembre de 2024];15(7):1596. Disponible en:
<https://www.mdpi.com/2073-4360/15/7/1596/htm>
225. Martínez G, Merinero M, Pérez-Aranda M, Pérez-Soriano EM, Ortiz T, Begines B, et al. Environmental Impact of Nanoparticles' Application as an Emerging Technology: A Review. *Materials* 2021, Vol 14, Page 166 [Internet]. 31 de diciembre de 2020 [citado 4 de septiembre de 2024];14(1):166. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/1/166/htm>
226. Domingues C, Santos A, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Jarak I, Veiga F, et al. Where Is Nano Today and Where Is It Headed? A Review of Nanomedicine and the Dilemma of Nanotoxicology. *ACS Nano* [Internet]. 26 de julio de 2022 [citado 4 de septiembre de 2024];16(7):9994-10041. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsnano.2c00128>
227. Ali F, Neha K, Parveen S. Current regulatory landscape of nanomaterials and nanomedicines: A global perspective. *J Drug Deliv Sci Technol*. 1 de febrero de 2023;80:104118.
228. Foulkes R, Man E, Thind J, Yeung S, Joy A, Hoskins C. The regulation of nanomaterials and nanomedicines for clinical application: current and future perspectives. *Biomater Sci* [Internet]. 25 de agosto de 2020 [citado 4 de septiembre de 2024];8(17):4653-64. Disponible en:
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/bm/d0bm00558d>

229. Liu R, Luo C, Pang Z, Zhang J, Ruan S, Wu M, et al. Advances of nanoparticles as drug delivery systems for disease diagnosis and treatment. *Chinese Chemical Letters*. 1 de febrero de 2023;34(2):107518.
230. Hamimed S, Jabberi M, Chatti A. Nanotechnology in drug and gene delivery. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2022 395:7 [Internet]. 4 de mayo de 2022 [citado 4 de septiembre de 2024];395(7):769-87. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00210-022-02245-z>
231. Mirón-Barroso S, Domènech EB, Trigueros S. Nanotechnology-Based Strategies to Overcome Current Barriers in Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 8537 [Internet]. 9 de agosto de 2021 [citado 4 de septiembre de 2024];22(16):8537. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/16/8537/htm>
232. Lee DY, Amirthalingam S, Lee C, Rajendran AK, Ahn YH, Hwang NS. Strategies for targeted gene delivery using lipid nanoparticles and cell-derived nanovesicles. *Nanoscale Adv* [Internet]. 25 de julio de 2023 [citado 4 de septiembre de 2024];5(15):3834-56. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2023/na/d3na00198a>
233. Woźniak M, Płoska A, Siekierzycka A, Dobrucki LW, Kalinowski L, Dobrucki IT. Molecular Imaging and Nanotechnology—Emerging Tools in Diagnostics and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 2658 [Internet]. 28 de febrero de 2022 [citado 4 de septiembre de 2024];23(5):2658. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/5/2658/htm>
234. Dessale M, Mengistu G, Mengist HM. Nanotechnology: A Promising Approach for Cancer Diagnosis, Therapeutics and Theragnosis. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2022 [citado 4 de septiembre de 2024];17:3735. Disponible en: [/pmc/articles/PMC9427008/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39427008/)
235. Kemp JA, Kwon YJ. Cancer nanotechnology: current status and perspectives. *Nano Convergence* 2021 8:1 [Internet]. 2 de noviembre de 2021 [citado 4 de septiembre de 2024];8(1):1-38. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s40580-021-00282-7>
236. Jin C, Wang K, Oppong-Gyebi A, Hu J. Application of Nanotechnology in Cancer Diagnosis and Therapy - A Mini-Review. *Int J Med Sci* [Internet]. 2020 [citado 4 de septiembre de 2024];17(18):2964. Disponible en: [/pmc/articles/PMC7646098/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37646098/)
237. Munir MU, Ahmed A, Usman M, Salman S. Recent advances in nanotechnology-aided materials in combating microbial resistance and functioning as antibiotics substitutes. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2020 [citado 4 de septiembre de 2024];15:7329-58. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=dijn20>

238. Mubeen B, Ansar AN, Rasool R, Ullah I, Imam SS, Alshehri S, et al. Nanotechnology as a Novel Approach in Combating Microbes Providing an Alternative to Antibiotics. *Antibiotics* 2021, Vol 10, Page 1473 [Internet]. 30 de noviembre de 2021 [citado 4 de septiembre de 2024];10(12):1473. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/12/1473/htm>
239. Pala R, Anju VT, Dyavaiah M, Busi S, Nauli SM. Nanoparticle-mediated drug delivery for the treatment of cardiovascular diseases. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2020 [citado 4 de septiembre de 2024];15:3741-69. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=dijn20>
240. Pala R, Pattnaik S, Busi S, Nauli SM. Nanomaterials as Novel Cardiovascular Theranostics. *Pharmaceutics* 2021, Vol 13, Page 348 [Internet]. 7 de marzo de 2021 [citado 4 de septiembre de 2024];13(3):348. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/3/348/htm>
241. Alagarsamy KN, Mathan S, Yan W, Rafieerad A, Sekaran S, Manego H, et al. Carbon nanomaterials for cardiovascular theranostics: Promises and challenges. *Bioact Mater*. 1 de agosto de 2021;6(8):2261-80.
242. Chopra H, Bibi S, Mishra AK, Tirth V, Yerramsetty SV, Murali SV, et al. Nanomaterials: A Promising Therapeutic Approach for Cardiovascular Diseases. *J Nanomater* [Internet]. 1 de enero de 2022 [citado 4 de septiembre de 2024];2022(1):4155729. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2022/4155729>
243. Rodrigues MS, de Paula GC, Duarte MB, de Rezende VL, Possato JC, Farias HR, et al. Nanotechnology as a therapeutic strategy to prevent neuropsychomotor alterations associated with hypercholesterolemia. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1 de mayo de 2021;201:111608.
244. Trandafir LM, Dodi G, Frasinariu O, Luca AC, Butnariu LI, Tarca E, et al. Tackling Dyslipidemia in Obesity from a Nanotechnology Perspective. *Nutrients* 2022, Vol 14, Page 3774 [Internet]. 13 de septiembre de 2022 [citado 4 de septiembre de 2024];14(18):3774. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/18/3774/htm>
245. Chu DT, Thi HV, Nguyen TT, Vu TD, Thi YVN, Mani I, et al. Nanotechnology and nucleic acid nanoparticles for treatment of metabolic disorders. *OpenNano*. 1 de septiembre de 2023;13:100181.
246. Li Y, Zhang W, Zhao R, Zhang X. Advances in oral peptide drug nanoparticles for diabetes mellitus treatment. *Bioact Mater*. 1 de septiembre de 2022;15:392-408.
247. Ngowi EE, Wang YZ, Qian L, Helmy YASH, Anyomi B, Li T, et al. The Application of Nanotechnology for the Diagnosis and Treatment of Brain Diseases and Disorders. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2 de marzo de 2021 [citado 4 de septiembre de 2024];9:629832. Disponible en: www.frontiersin.org

248. Wu DD, Salah YA, Ngowi EE, Zhang YX, Khattak S, Khan NH, et al. Nanotechnology prospects in brain therapeutics concerning gene-targeting and nose-to-brain administration. *iScience* [Internet]. 18 de agosto de 2023 [citado 4 de septiembre de 2024];26(8):107321. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S2589004223013986/fulltext>
249. Giakoumettis D, Sgouros S. Nanotechnology in neurosurgery: a systematic review. *Child's Nervous System* [Internet]. 1 de abril de 2021 [citado 4 de septiembre de 2024];37(4):1045-54. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00381-020-05008-4>
250. Mittal KR, Pharasi N, Sarna B, Singh M, Rachana, Haider S, et al. Nanotechnology-based drug delivery for the treatment of CNS disorders. *Transl Neurosci* [Internet]. 1 de enero de 2022 [citado 4 de septiembre de 2024];13(1):527-46. Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/tnsci-2022-0258/html>
251. Nguyen TT, Dung Nguyen TT, Vo TK, Tran NMA, Nguyen MK, Van Vo T, et al. Nanotechnology-based drug delivery for central nervous system disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1 de noviembre de 2021;143:112117.
252. Del Grosso A, Parlanti G, Mezzena R, Cecchini M. Current treatment options and novel nanotechnology-driven enzyme replacement strategies for lysosomal storage disorders. *Adv Drug Deliv Rev*. 1 de septiembre de 2022;188:114464.
253. Faouzi A, Roullin VG. Think Big, Start Small: How Nanomedicine Could Alleviate the Burden of Rare CNS Diseases. *Pharmaceuticals* 2021, Vol 14, Page 109 [Internet]. 30 de enero de 2021 [citado 4 de septiembre de 2024];14(2):109. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/2/109/htm>
254. Tambuyzer E, Vandendriessche B, Austin CP, Brooks PJ, Larsson K, Miller Needleman KI, et al. Therapies for rare diseases: therapeutic modalities, progress and challenges ahead. *Nature Reviews Drug Discovery* 2019 19:2 [Internet]. 13 de diciembre de 2019 [citado 4 de septiembre de 2024];19(2):93-111. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41573-019-0049-9>
255. 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* [Internet]. 14 de julio de 2020 [citado 4 de septiembre de 2024];11:520004. Disponible en: www.frontiersin.org
256. McGoron AJ. Perspectives on the Future of Nanomedicine to Impact Patients: An Analysis of US Federal Funding and Interventional Clinical Trials. *Bioconjug Chem* [Internet]. 18 de marzo de 2020 [citado 4 de septiembre de 2024];31(3):436-47. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.bioconjchem.9b00818>

257. Morales CS, Grodzinski P. Current landscape of treating different cancers using nanomedicines: Trends and perspectives. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* [Internet]. 1 de enero de 2024 [citado 4 de septiembre de 2024];16(1):e1927. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/wnan.1927>
258. Durán-Lobato M, López-Estévez AM, Cordeiro AS, Dacoba TG, Crecente-Campo J, Torres D, et al. Nanotechnologies for the delivery of biologicals: Historical perspective and current landscape. *Adv Drug Deliv Rev*. 1 de septiembre de 2021;176:113899.
259. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res* [Internet]. 1 de octubre de 2016 [citado 4 de septiembre de 2024];33(10):2373-87. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-016-1958-5>
260. Search for: Other terms: nanoparticles | Card Results | ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 9 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/search?term=nanoparticles>
261. Khan FA. Nanocarriers-Based Products in the Market, FDA Approval, Commercialization of Nanocarriers, and Global Market. *Nano Drug Delivery for Cancer Therapy* [Internet]. 2023 [citado 7 de septiembre de 2024];137-48. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-99-6940-1_7
262. Abdel-Mageed HM, AbuelEzz NZ, Radwan RA, Mohamed SA. Nanoparticles in nanomedicine: a comprehensive updated review on current status, challenges and emerging opportunities. *J Microencapsul* [Internet]. 2021 [citado 24 de septiembre de 2024];38(6):414-36. Disponible en: <https://www.tandfonline-com.sire.ub.edu/doi/abs/10.1080/02652048.2021.1942275>
263. Banala VT, Mukherjee D, Mahajan S, Singh PK. Current status of FDA-approved marketed nano drug products: regulatory considerations. *Multifunctional Nanocarriers*. 1 de enero de 2022;501-21.
264. Jia Y, Jiang Y, He Y, Zhang W, Zou J, Magar KT, et al. Approved Nanomedicine against Diseases. *Pharmaceutics* [Internet]. 1 de marzo de 2023 [citado 24 de septiembre de 2024];15(3). Disponible en: [/pmc/articles/PMC10059816/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4059816/)
265. 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. *Acta Pharm Sin B*. 1 de julio de 2022;12(7):3028-48.
266. Namiot ED, Sokolov A V., Chubarev VN, Tarasov V V., Schiöth HB. Nanoparticles in Clinical Trials: Analysis of Clinical Trials, FDA Approvals and Use for COVID-19 Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 787 [Internet]. 2 de enero de 2023 [citado 24 de septiembre de 2024];24(1):787. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/1/787/htm>

267. Abdellatif AAH, Alsowinea AF. Approved and marketed nanoparticles for disease targeting and applications in COVID-19. *Nanotechnol Rev* [Internet]. 1 de enero de 2021 [citado 24 de septiembre de 2024];10(1):1941-77. Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/ntrev-2021-0115/html?lang=en>
268. Eusébio MES, Castro RAE, Canotilho J. Drug Nanocrystals. *Nanoparticles for Brain Drug Delivery* [Internet]. 15 de marzo de 2021 [citado 24 de septiembre de 2024];211-55. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781003119326-9/drug-nanocrystals-ermelinda-eus%C3%A9bio-ricardo-castro-jo%C3%A4o-canotilho>
269. Peltonen L, Hirvonen J, Laaksonen T. Drug Nanocrystals and Nanosuspensions in Medicine. octubre de 2014;169-97.
270. Anselmo AC, Mitragotri | Samir, Mitragotri S, Paulson JA. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med* [Internet]. 1 de septiembre de 2019 [citado 24 de septiembre de 2024];4(3):e10143. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/btm2.10143>
271. van Hoogevest P, Tiemessen H, Metselaar JM, Drescher S, Fahr A. The Use of Phospholipids to Make Pharmaceutical Form Line Extensions. *European Journal of Lipid Science and Technology* [Internet]. 1 de abril de 2021 [citado 24 de septiembre de 2024];123(4):2000297. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ejlt.202000297>
272. Johnsson M, Barauskas J, Norlin A, Tiberg F. Physicochemical and Drug Delivery Aspects of Lipid-Based Liquid Crystalline Nanoparticles: A Case Study of Intravenously Administered Propofol. *J Nanosci Nanotechnol*. septiembre de 2006;6(9-10):3017-24.
273. Rüger J, Ioannou S, Castanotto D, Stein CA. Oligonucleotides to the (Gene) Rescue: FDA Approvals 2017–2019. Vol. 41, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd; 2020. p. 27-41.
274. Weng Y, Xiao H, Zhang J, Liang XJ, Huang Y. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. Vol. 37, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2019. p. 801-25.
275. Hallas D, Spratling R, Fletcher J. Methodological Analysis: Randomized Controlled Trials for Pfizer and Moderna COVID-19 Vaccines. *Journal of Pediatric Health Care*. 31 de mayo de 2021;
276. Clogston JD, Foss W, Harris D, Oberoi H, Pan J, Pu E, et al. Current state of nanomedicine drug products: An industry perspective. *J Pharm Sci* [Internet]. 12 de septiembre de 2024 [citado 24 de septiembre de 2024]; Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354924004155>
277. Mandal S Das, Mandal S, Pathak Y V., Patel JK. Current challenges and future directions in nanomedicine. *Emerging Technologies for Nanoparticle*

- Manufacturing [Internet]. 23 de junio de 2021 [citado 24 de septiembre de 2024];575-83. Disponible en:
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-50703-9_27
278. Halwani AA. Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market. *Pharmaceutics* 2022, Vol 14, Page 106 [Internet]. 3 de enero de 2022 [citado 24 de septiembre de 2024];14(1):106. Disponible en:
<https://www.mdpi.com/1999-4923/14/1/106/htm>
 279. Puri S, Mazza M, Roy G, England RM, Zhou L, Nourian S, et al. Evolution of nanomedicine formulations for targeted delivery and controlled release. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de septiembre de 2023;200:114962.
 280. Thapa RK, Kim JO. Nanomedicine-based commercial formulations: current developments and future prospects. *Journal of Pharmaceutical Investigation* 2022 53:1 [Internet]. 19 de diciembre de 2022 [citado 1 de diciembre de 2023];53(1):19-33. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s40005-022-00607-6>
 281. Youssef M, Hitti C, Puppín Chaves Fulber J, Kamen AA. Enabling mRNA Therapeutics: Current Landscape and Challenges in Manufacturing. *Biomolecules* 2023, Vol 13, Page 1497 [Internet]. 9 de octubre de 2023 [citado 9 de octubre de 2024];13(10):1497. Disponible en:
<https://www.mdpi.com/2218-273X/13/10/1497/htm>
 282. Tomalia DA, Fréchet MJ. Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective*. *J Polym Sci A Polym Chem* [Internet]. 15 de agosto de 2002 [citado 25 de septiembre de 2024];40(16):2719-28. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pola.10301>
 283. Hsu HJ, Bugno J, Lee SR, Hong S. Dendrimer-based nanocarriers: a versatile platform for drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* [Internet]. 1 de enero de 2017 [citado 25 de septiembre de 2024];9(1):e1409. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/wnan.1409>
 284. Mendes LP, Pan J, Torchilin VP. Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy. *Molecules* 2017, Vol 22, Page 1401 [Internet]. 23 de agosto de 2017 [citado 25 de septiembre de 2024];22(9):1401. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/9/1401/htm>
 285. Mogoşanu GD, Grumezescu AM, Bejenaru C, Bejenaru LE. Polymeric protective agents for nanoparticles in drug delivery and targeting. *Int J Pharm.* 30 de agosto de 2016;510(2):419-29.
 286. Chan JM, Valencia PM, Zhang L, Langer R, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticles for drug delivery. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2010 [citado 25 de septiembre de 2024];624:163-75. Disponible en:
https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-609-2_11
 287. Kamaly N, Yameen B, Wu J, Farokhzad OC. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug

- release. *Chem Rev* [Internet]. 24 de febrero de 2016 [citado 25 de septiembre de 2024];116(4):2602-63. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.5b00346>
288. Yoon G, Park JW, Yoon IS. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): Recent advances in drug delivery. *J Pharm Investig* [Internet]. 11 de octubre de 2013 [citado 25 de septiembre de 2024];43(5):353-62. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40005-013-0087-y>
 289. Xu W, Ling P, Zhang T. Polymeric Micelles, a Promising Drug Delivery System to Enhance Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. *J Drug Deliv* [Internet]. 27 de junio de 2013 [citado 25 de septiembre de 2024];2013:1-15. Disponible en: [/pmc/articles/PMC3712247/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24412247/)
 290. Kopeček J, Yang J. Polymer nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev*. 1 de enero de 2020;156:40-64.
 291. Thakor P, Bhavana V, Sharma R, Srivastava S, Singh SB, Mehra NK. Polymer–drug conjugates: recent advances and future perspectives. *Drug Discov Today*. 1 de septiembre de 2020;25(9):1718-26.
 292. Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 22 de mayo de 2008;60(8):876-85.
 293. Kianfar E. Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology* 2021 19:1 [Internet]. 29 de mayo de 2021 [citado 25 de septiembre de 2024];19(1):1-32. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12951-021-00896-3>
 294. D. Hill B, Zak A, Khera E, Wen F. Engineering Virus-like Particles for Antigen and Drug Delivery. *Curr Protein Pept Sci*. 29 de noviembre de 2017;19(1).
 295. Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov Today*. 15 de mayo de 2002;7(10):569-79.
 296. Caló E, Khutoryanskiy V V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur Polym J*. 1 de abril de 2015;65:252-67.
 297. Negri V, Pacheco-Torres J, Calle D, López-Larrubia P. Carbon Nanotubes in Biomedicine. *Top Curr Chem* [Internet]. 2020 [citado 25 de septiembre de 2024];378:177-217. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-55502-3_6
 298. Parvin N, Kumar V, Joo SW, Mandal TK. Emerging Trends in Nanomedicine: Carbon-Based Nanomaterials for Healthcare. *Nanomaterials* 2024, Vol 14, Page 1085 [Internet]. 25 de junio de 2024 [citado 25 de septiembre de 2024];14(13):1085. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-4991/14/13/1085/htm>

299. Xu J, Chow EKH. Biomedical applications of nanodiamonds: From drug-delivery to diagnostics. *SLAS Technol.* 1 de agosto de 2023;28(4):214-22.
300. Perevedentseva E, Lin YC, Cheng CL. A review of recent advances in nanodiamond-mediated drug delivery in cancer. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 4 de marzo de 2021 [citado 25 de septiembre de 2024];18(3):369-82. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17425247.2021.1832988>
301. Shahalaei M, Azad AK, Sulaiman WMAW, Derakhshani A, Mofakham EB, Mallandrich M, et al. A review of metallic nanoparticles: present issues and prospects focused on the preparation methods, characterization techniques, and their theranostic applications. *Front Chem.* 14 de agosto de 2024;12:1398979.
302. Chandrakala V, Aruna V, Angajala G. Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems. *Emergent Materials* 2021 5:6 [Internet]. 4 de enero de 2022 [citado 25 de septiembre de 2024];5(6):1593-615. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42247-021-00335-x>
303. Xu JJ, Zhang WC, Guo YW, Chen XY, Zhang YN. Metal nanoparticles as a promising technology in targeted cancer treatment. *Drug Deliv* [Internet]. 31 de diciembre de 2022 [citado 25 de septiembre de 2024];29(1):664-78. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10717544.2022.2039804>
304. Badıllı U, Mollarasouli F, Bakirhan NK, Ozkan Y, Ozkan SA. Role of quantum dots in pharmaceutical and biomedical analysis, and its application in drug delivery. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 1 de octubre de 2020;131:116013.
305. Guo W, Song X, Liu J, Liu W, Chu X, Lei Z. Quantum Dots as a Potential Multifunctional Material for the Enhancement of Clinical Diagnosis Strategies and Cancer Treatments. *Nanomaterials* 2024, Vol 14, Page 1088 [Internet]. 25 de junio de 2024 [citado 25 de septiembre de 2024];14(13):1088. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-4991/14/13/1088/htm>
306. Gidwani B, Sahu V, Shukla SS, Pandey R, Joshi V, Jain VK, et al. Quantum dots: Prospectives, toxicity, advances and applications. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1 de febrero de 2021;61:102308.
307. Manzano M, Vallet-Regí M, Manzano M, Vallet-Regí M. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Adv Funct Mater* [Internet]. 1 de enero de 2020 [citado 25 de septiembre de 2024];30(2):1902634. Disponible en: <https://onlinelibrary-wiley-com.sire.ub.edu/doi/full/10.1002/adfm.201902634>
308. Castillo Henríquez L, Bahloul B, Alhareth K, Oyoum F, Frejková M, Kostka L, et al. Step-By-Step Standardization of the Bottom-Up Semi-Automated Nanocrystallization of Pharmaceuticals: A Quality By Design and Design of

- Experiments Joint Approach. *Small* [Internet]. 1 de junio de 2024 [citado 4 de septiembre de 2024];20(25):2306054. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/sml.202306054>
309. Qi D, Cao Z, Ziener U. Recent advances in the preparation of hybrid nanoparticles in miniemulsions. *Adv Colloid Interface Sci*. 1 de septiembre de 2014;211:47-62.
 310. Makowski M, Silva ÍC, Do Amaral CP, Gonçalves S, Santos NC. Advances in Lipid and Metal Nanoparticles for Antimicrobial Peptide Delivery. *Pharmaceutics* 2019, Vol 11, Page 588 [Internet]. 8 de noviembre de 2019 [citado 26 de septiembre de 2024];11(11):588. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/11/11/588/htm>
 311. Sivadasan D, Sultan MH, Madkhali O, Almoshari Y, Thangavel N. Polymeric Lipid Hybrid Nanoparticles (PLNs) as Emerging Drug Delivery Platform—A Comprehensive Review of Their Properties, Preparation Methods, and Therapeutic Applications. *Pharmaceutics* 2021, Vol 13, Page 1291 [Internet]. 18 de agosto de 2021 [citado 26 de septiembre de 2024];13(8):1291. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/8/1291/htm>
 312. Sierra-Martin B, Fernandez-Barbero A. Inorganic/polymer hybrid nanoparticles for sensing applications. *Adv Colloid Interface Sci*. 1 de julio de 2016;233:25-37.
 313. Ferreira Soares DC, Domingues SC, Viana DB, Tebaldi ML. Polymer-hybrid nanoparticles: Current advances in biomedical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1 de noviembre de 2020;131:110695.
 314. Zhang C, Yan L, Wang X, Zhu S, Chen C, Gu Z, et al. Progress, challenges, and future of nanomedicine. *Nano Today*. 1 de diciembre de 2020;35:101008.
 315. Tewabe A, Abate A, Tamrie M, Seyfu A, Siraj EA. Targeted drug delivery — from magic bullet to nanomedicine: Principles, challenges, and future perspectives. *J Multidiscip Healthc* [Internet]. 2021 [citado 25 de septiembre de 2024];14:1711-24. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=djmd20>
 316. Pottoo FH, Sharma S, Javed MN, Barkat MA, Harshita, Alam MS, et al. Lipid-based nanoformulations in the treatment of neurological disorders. Vol. 52, *Drug Metabolism Reviews*. Taylor and Francis Ltd; 2020. p. 185-204.
 317. Yonezawa S, Koide H, Asai T. Recent advances in siRNA delivery mediated by lipid-based nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 6 de agosto de 2020 [citado 19 de noviembre de 2020]; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.022>
 318. Lingayat V, Zarekar N, Res RS. *Nanosci Nanotechnol*, 2017 undefined. Solid lipid nanoparticles: a review. Citeseer VJ Lingayat, NS Zarekar, RS Shendge. *Nanosci Nanotechnol Res*, 2017•Citeseer [Internet]. 2017 [citado

29 de agosto de 2024];4(2):67-72. Disponible en:
<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=c9a1a393b99c877f67f525bf37b031cdc8ac6136>

319. Akbari J, Saeedi M, Ahmadi F, Mohammad S, Hashemi H, Babaei A, et al. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a review of the methods of manufacture and routes of administration. <https://doi.org/101080/1083745020222084554> [Internet]. 14 de julio de 2022 [citado 19 de julio de 2022];1-53. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10837450.2022.2084554>
320. Khairnar S V., Pagare P, Thakre A, Nambiar AR, Junnuthula V, Abraham MC, et al. Review on the Scale-Up Methods for the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics* 2022, Vol 14, Page 1886 [Internet]. 6 de septiembre de 2022 [citado 26 de agosto de 2024];14(9):1886. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/9/1886/htm>
321. Vargas R, Lizano-Barrantes C, Romero M, Valencia-Clua K, Narváez-Narváez DA, Suñé-Negre JM, et al. The piper at the gates of brain: A systematic review of surface modification strategies on lipid nanoparticles to overcome the Blood-Brain-Barrier. *Int J Pharm* [Internet]. 15 de noviembre de 2024 [citado 18 de septiembre de 2024];665(124686). Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517324009207>
322. Hald Albertsen C, Kulkarni JA, Witzigmann D, Lind M, Petersson K, Simonsen JB. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de septiembre de 2022;188:114416.
323. Hou X, Zaks T, Langer R, Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials* 2021 6:12 [Internet]. 10 de agosto de 2021 [citado 17 de marzo de 2022];6(12):1078-94. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41578-021-00358-0>
324. Wissing SA, Kayser O, Müller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(9):1257-72.
325. Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives [Internet]. Vols. 154-155, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2020 [citado 15 de diciembre de 2020]. p. 37-63. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.002>
326. Veiga N, Diesendruck Y, Peer D. Targeted nanomedicine: Lessons learned and future directions. *Journal of Controlled Release.* 1 de marzo de 2023;355:446-57.
327. Menon I, Zaroudi M, Zhang Y, Aisenbrey E, Hui L. Fabrication of active targeting lipid nanoparticles: Challenges and perspectives. *Mater Today Adv.* 1 de diciembre de 2022;16.
328. Subramaniam B, Siddik ZH, Nagoor NH. Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. *Journal of Nanoparticle Research* [Internet]. 1 de

junio de 2020 [citado 25 de septiembre de 2024];22(6):1-29. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-020-04848-0>

329. Xu L, Wang X, Liu Y, Yang G, Falconer RJ, Zhao CX. Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. *Adv Nanobiomed Res* [Internet]. 1 de febrero de 2022 [citado 25 de septiembre de 2024];2(2):2100109. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anbr.202100109>
330. Seo Y, Lim H, Park H, Yu J, An J, Yoo HY, et al. Recent Progress of Lipid Nanoparticles-Based Lipophilic Drug Delivery: Focus on Surface Modifications. *Pharmaceutics* 2023, Vol 15, Page 772 [Internet]. 26 de febrero de 2023 [citado 25 de septiembre de 2024];15(3):772. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/3/772/htm>
331. Moholkar DN, Kandimalla R, Gupta RC, Aqil F. Advances in lipid-based carriers for cancer therapeutics: Liposomes, exosomes and hybrid exosomes. *Cancer Lett*. 1 de julio de 2023;565.
332. Li M, Du C, Guo N, Teng Y, Meng X, Sun H, et al. Composition design and medical application of liposomes. Vol. 164, *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS; 2019. p. 640-53.
333. Kumar R. Lipid-Based Nanoparticles for Drug-Delivery Systems. En: *Nanocarriers for Drug Delivery*. Elsevier; 2019. p. 249-84.
334. Elmowafy M, Al-Sanea MM. Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and delivery strategies. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 1 de septiembre de 2021;29(9):999-1012.
335. Chauhan I, Yasir M, Verma M, Singh AP. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. *Adv Pharm Bull* [Internet]. 2020 [citado 25 de septiembre de 2024];10(2):150. Disponible en: [/pmc/articles/PMC7191226/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37191226/)
336. Gilbert J, Sebastiani F, Arteta MY, Terry A, Fornell A, Russell R, et al. Evolution of the structure of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: From in situ studies of formulation to colloidal stability. *J Colloid Interface Sci*. 15 de abril de 2024;660:66-76.
337. Eygeris Y, Gupta M, Kim J, Sahay G. Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery. *Acc Chem Res* [Internet]. 4 de enero de 2022 [citado 25 de septiembre de 2024];55(1):2-12. Disponible en: [https://pubs-ac-sire.ub.edu/doi/full/10.1021/acs.accounts.1c00544](https://pubs.acs.org/sire.ub.edu/doi/full/10.1021/acs.accounts.1c00544)
338. Mashima R, Takada S. Lipid Nanoparticles: A Novel Gene Delivery Technique for Clinical Application. *Current Issues in Molecular Biology* 2022, Vol 44, Pages 5013-5027 [Internet]. 19 de octubre de 2022 [citado 1 de diciembre de 2023];44(10):5013-27. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1467-3045/44/10/341/htm>
339. Evers MJW, Kulkarni JA, van der Meel R, Cullis PR, Vader P, Schiffelers RM. State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Small Methods* [Internet]. 1 de

septiembre de 2018 [citado 3 de febrero de 2021];2(9):1700375. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/smt.201700375>

340. Kulkarni JA, Cullis PR, Van Der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic Acid Ther* [Internet]. 1 de junio de 2018 [citado 3 de febrero de 2021];28(3):146-57. Disponible en: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/nat.2018.0721>
341. Tsakiri M, Zivko C, Demetzos C, Mahairaki V. Lipid-based nanoparticles and RNA as innovative neuro-therapeutics. *Front Pharmacol*. 9 de agosto de 2022;13:900610.
342. Zhao YQ, Li LJ, Zhou EF, Wang JY, Wang Y, Guo LM, et al. Lipid-Based Nanocarrier Systems for Drug Delivery: Advances and Applications. *Pharmaceutical Fronts* [Internet]. junio de 2022 [citado 25 de septiembre de 2024];04(02):e43-60. Disponible en: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0042-1751036>
343. Leung AKK, Tam YYC, Cullis PR. Lipid Nanoparticles for Short Interfering RNA Delivery. *Adv Genet*. 1 de enero de 2014;88:71-110.
344. Brader ML, Williams SJ, Banks JM, Hui WH, Zhou ZH, Jin L. Encapsulation state of messenger RNA inside lipid nanoparticles. *Biophys J* [Internet]. 20 de julio de 2021 [citado 25 de septiembre de 2024];120(14):2766-70. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S0006349521002411/fulltext>
345. Finn JD, Smith AR, Patel MC, Shaw L, Youniss MR, van Heteren J, et al. A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep* [Internet]. 27 de febrero de 2018 [citado 25 de septiembre de 2024];22(9):2227-35. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S2211124718301827/fulltext>
346. Rosenblum D, Gutkin A, Kedmi R, Ramishetti S, Veiga N, Jacobi AM, et al. CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy. *Sci Adv* [Internet]. 18 de noviembre de 2020 [citado 25 de septiembre de 2024];6(47):9450-68. Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abc9450>
347. Mukai H, Ogawa K, Kato N, Kawakami S. Recent advances in lipid nanoparticles for delivery of nucleic acid, mRNA, and gene editing-based therapeutics. *Drug Metab Pharmacokinet*. 1 de junio de 2022;44:100450.
348. De A, Ko YT. A tale of nucleic acid-ionizable lipid nanoparticles: Design and manufacturing technology and advancement. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2 de enero de 2023 [citado 25 de septiembre de 2024];20(1):75-91. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17425247.2023.2153832>
349. News RCCE, 2021 undefined. Without these lipid shells, there would be no mRNA vaccines for COVID-19. *originalrebel.net* R CrossChem Eng News, 2021•originalrebel.net [Internet]. [citado 26 de agosto de 2024]; Disponible

en: <https://originalrebel.net/wp-content/uploads/2021/08/Without-these-lipid-shells-there-would-be-no-mRNA-vaccines-for-COVID-19.pdf>

350. Slaughter K V., Donders EN, Jones MS, Sabbah SG, Elliott MJ, Shoichet BK, et al. Ionizable Drugs Enable Intracellular Delivery of Co-Formulated siRNA. *Advanced Materials* [Internet]. 2024 [citado 25 de septiembre de 2024];2403701. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adma.202403701>
351. Schlich M, Palomba R, Costabile G, Mizrahy S, Pannuzzo M, Peer D, et al. Cytosolic delivery of nucleic acids: The case of ionizable lipid nanoparticles. *Bioeng Transl Med*. 1 de mayo de 2021;6(2).
352. Gilleron J, Querbes W, Zeigerer A, Borodovsky A, Marsico G, Schubert U, et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nature Biotechnology* 2013 31:7 [Internet]. 23 de junio de 2013 [citado 25 de septiembre de 2024];31(7):638-46. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nbt.2612>
353. Abid N, Khan AM, Shujait S, Chaudhary K, Ikram M, Imran M, et al. Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Adv Colloid Interface Sci*. 1 de febrero de 2022;300:102597.
354. Khan FA. Synthesis of nanomaterials: Methods & technology. *Applications of Nanomaterials in Human Health* [Internet]. 1 de enero de 2020 [citado 3 de junio de 2024];15-21. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-4802-4_2
355. Mehta M, Bui TA, Yang X, Aksoy Y, Goldys EM, Deng W. Lipid-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery: An Overview of the Production Techniques and Difficulties Encountered in Their Industrial Development. *ACS Materials Au* [Internet]. 8 de noviembre de 2023 [citado 28 de agosto de 2024];3(6):600-19. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsmaterialsau.3c00032>
356. Kumar R, Dkhar DS, Kumari R, Divya, Mahapatra S, Dubey VK, et al. Lipid based nanocarriers: Production techniques, concepts, and commercialization aspect. *J Drug Deliv Sci Technol*. 1 de agosto de 2022;74:103526.
357. Anderluzzi G, Anderluzzi G, Lou G, Lou G, Su Y, Su Y, et al. Scalable Manufacturing Processes for Solid Lipid Nanoparticles. *Pharm Nanotechnol*. 25 de septiembre de 2019;7(6):444-59.
358. 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*. 1 de diciembre de 2017;6:37-56.

359. Prakash G, Shokr A, Willemen N, Bashir SM, Shin SR, Hassan S. Microfluidic fabrication of lipid nanoparticles for the delivery of nucleic acids. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de mayo de 2022;184:114197.
360. Roces CB, Lou G, Jain N, Abraham S, Thomas A, Halbert GW, et al. Manufacturing Considerations for the Development of Lipid Nanoparticles Using Microfluidics. *Pharmaceutics* 2020, Vol 12, Page 1095 [Internet]. 15 de noviembre de 2020 [citado 18 de julio de 2022];12(11):1095. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/11/1095/htm>
361. Naziris N, Demetzos C. Liposomes: Production Methods and Application in Alzheimer's Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1339:385-94.
362. Has C, Sunthar P. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. *J Liposome Res* [Internet]. 1 de octubre de 2020 [citado 26 de septiembre de 2024];30(4):336-65. Disponible en: <https://www-tandfonline-com.sire.ub.edu/doi/abs/10.1080/08982104.2019.1668010>
363. Ali MS, Hooshmand N, El-Sayed M, Labouta HI. Microfluidics for Development of Lipid Nanoparticles: Paving the Way for Nucleic Acids to the Clinic. *ACS Appl Bio Mater* [Internet]. 2021 [citado 12 de julio de 2022];13:8. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00732>
364. Colombo S, Beck-Broichsitter M, Bøtker JP, Malmsten M, Rantanen J, Bohr A. Transforming nanomedicine manufacturing toward Quality by Design and microfluidics. *Adv Drug Deliv Rev.* 15 de marzo de 2018;128:115-31.
365. Leung AKK, Tam YYC, Chen S, Hafez IM, Cullis PR. Microfluidic Mixing: A General Method for Encapsulating Macromolecules in Lipid Nanoparticle Systems. *Journal of Physical Chemistry B* [Internet]. 16 de julio de 2015 [citado 17 de junio de 2024];119(28):8698-706. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jpcb.5b02891>
366. Maeki M, Kimura N, Sato Y, Harashima H, Tokeshi M. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 15 de marzo de 2018;128:84-100.
367. Liu Y, Yang G, Hui Y, Ranaweera S, Zhao CX, Liu Y, et al. Microfluidic Nanoparticles for Drug Delivery. *Small* [Internet]. 1 de septiembre de 2022 [citado 26 de septiembre de 2024];18(36):2106580. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/sml.202106580>
368. Maeki M, Uno S, Niwa A, Okada Y, Tokeshi M. Microfluidic technologies and devices for lipid nanoparticle-based RNA delivery. *Journal of Controlled Release.* 1 de abril de 2022;344:80-96.
369. Li S, Hu Y, Li A, Lin J, Hsieh K, Schneiderman Z, et al. Payload distribution and capacity of mRNA lipid nanoparticles. *Nature Communications* 2022 13:1 [Internet]. 23 de septiembre de 2022 [citado 27 de septiembre de 2022];13:1

2024];13(1):1-13. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-33157-4>

370. Tomeh MA, Mansor MH, Hadianamrei R, Sun W, Zhao X. Optimization of large-scale manufacturing of biopolymeric and lipid nanoparticles using microfluidic swirl mixers. *Int J Pharm.* 25 de mayo de 2022;620:121762.
371. Giorello A, Nicastro A, Berli CLA. Microfluidic Platforms for the Production of Nanoparticles at Flow Rates Larger Than One Liter Per Hour. *Adv Mater Technol* [Internet]. 1 de septiembre de 2022 [citado 26 de septiembre de 2024];7(9):2101588. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/admt.202101588>
372. Carvalho BG, Ceccato BT, Michelin M, Han SW, Torre LG de la. Advanced Microfluidic Technologies for Lipid Nano-Microsystems from Synthesis to Biological Application. *Pharmaceutics* 2022, Vol 14, Page 141 [Internet]. 7 de enero de 2022 [citado 26 de septiembre de 2024];14(1):141. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/1/141/htm>
373. Aghamiri S, Talaei S, Ghavidel AA, Zandsalimi F, Masoumi S, Hafshejani NH, et al. Nanoparticles-mediated CRISPR/Cas9 delivery: Recent advances in cancer treatment. Vol. 56, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Editions de Sante; 2020.
374. Shalaby KE, Aouida M, Gupta V, Abdesslem H, El-Agnaf OMA. Development of non-viral vectors for neuronal-targeted delivery of CRISPR-Cas9 RNA-proteins as a therapeutic strategy for neurological disorders. *Biomater Sci.* 11 de julio de 2022;10(17):4959-77.
375. Miller JB, Siegwart DJ. Design of synthetic materials for intracellular delivery of RNAs: From siRNA-mediated gene silencing to CRISPR/Cas gene editing. 2018 [citado 23 de marzo de 2022]; Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2099-4>
376. 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* [Internet]. 18 de mayo de 2018 [citado 26 de julio de 2022];10(2):1-17. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/316027495/>
377. Rawal M, Singh A, Amiji MM. Quality-by-Design Concepts to Improve Nanotechnology-Based Drug Development. *Pharm Res* [Internet]. 1 de noviembre de 2019 [citado 12 de julio de 2022];36(11):1-20. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-019-2692-6>
378. Mourdikoudis S, Pallares RM, Thanh NTK. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* [Internet]. 13 de julio de 2018 [citado 27 de septiembre de 2024];10(27):12871-934. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/nr/c8nr02278j>

379. Fan Y, Marioli M, Zhang K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *J Pharm Biomed Anal.* 5 de enero de 2021;192:113642.
380. Modena MM, Rühle B, Burg TP, Wuttke S, Modena MM, Zurich E, et al. Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Advanced Materials [Internet]*. 1 de agosto de 2019 [citado 27 de septiembre de 2024];31(32):1901556. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adma.201901556>
381. Cunha S, Costa CP, Moreira JN, Sousa Lobo JM, Silva AC. Using the quality by design (QbD) approach to optimize formulations of lipid nanoparticles and nanoemulsions: A review. *Nanomedicine.* 1 de agosto de 2020;28:102206.
382. Vitorino C, Silva S, Gouveia F, Bicker J, Falcão A, Fortuna A. QbD-driven development of intranasal lipid nanoparticles for depression treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 1 de agosto de 2020;153:106-20.
383. Amasya G, Aksu B, Badilli U, Onay-Besikci A, Tarimci N. QbD guided early pharmaceutical development study: Production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. *Int J Pharm.* 30 de mayo de 2019;563:110-21.
384. Raina H, Kaur S, Jindal AB. Development of efavirenz loaded solid lipid nanoparticles: Risk assessment, quality-by-design (QbD) based optimisation and physicochemical characterisation. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1 de junio de 2017;39:180-91.
385. Waghule T, Dabholkar N, Gorantla S, Rapalli VK, Saha RN, Singhvi G. Quality by design (QbD) in the formulation and optimization of liquid crystalline nanoparticles (LCNPs): A risk based industrial approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 1 de septiembre de 2021;141:111940.
386. Sreeharsha N, Rajpoot K, Tekade M, Kalyane D, Nair AB, Venugopala KN, et al. Development of Metronidazole Loaded Chitosan Nanoparticles Using QbD Approach—A Novel and Potential Antibacterial Formulation. *Pharmaceutics* 2020, Vol 12, Page 920 [Internet]. 25 de septiembre de 2020 [citado 5 de septiembre de 2024];12(10):920. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/10/920/htm>
387. Soni G, Kale K, Shetty S, Gupta MK, Yadav KS. Quality by design (QbD) approach in processing polymeric nanoparticles loading anticancer drugs by high pressure homogenizer. *Heliyon [Internet]*. 1 de abril de 2020 [citado 5 de septiembre de 2024];6(4):e03846. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S2405844020306915/fulltext>
388. ICH. Pharmaceutical Development Q8 [Internet]. Vol. 8, ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2009. Disponible en: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf

389. Namjoshi S, Dabbaghi M, Roberts MS, Grice JE, Mohammed Y. Quality by Design: Development of the Quality Target Product Profile (QTPP) for Semisolid Topical Products. *Pharmaceutics* 2020, Vol 12, Page 287 [Internet]. 23 de marzo de 2020 [citado 5 de septiembre de 2024];12(3):287. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/3/287/htm>
390. Lee SH, Kim JK, Jee JP, Jang DJ, Park YJ, Kim JE. Quality by Design (QbD) application for the pharmaceutical development process. *Journal of Pharmaceutical Investigation* 2022 52:6 [Internet]. 29 de agosto de 2022 [citado 28 de agosto de 2024];52(6):649-82. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40005-022-00575-x>
391. Mishra V, Thakur S, Patil A, Shukla A. Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 3 de agosto de 2018 [citado 5 de septiembre de 2024];15(8):737-58. Disponible en: <https://www.tandfonline-com.sire.ub.edu/doi/abs/10.1080/17425247.2018.1504768>
392. Fukuda IM, Pinto CFF, Moreira CDS, Saviano AM, Lourenço FR. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 8 de noviembre de 2018 [citado 5 de septiembre de 2024];54(Special Issue):e01006. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/bjps/a/zwwMpgN95HsPkzTG9B5FpWg/?lang=en&format=html>
393. Kolekar YM. Understanding of DoE and its advantages in Pharmaceutical development as per QbD Approach. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*. 2019;9(4):271.
394. Beg S, Hasnain MS, Rahman M, Swain S. Introduction to Quality by Design (QbD): Fundamentals, Principles, and Applications. *Pharmaceutical Quality by Design: Principles and Applications*. 1 de enero de 2019;1-17.
395. Adam S, Suzzi D, Radeke C, Khinast JG. An integrated Quality by Design (QbD) approach towards design space definition of a blending unit operation by Discrete Element Method (DEM) simulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 18 de enero de 2011;42(1-2):106-15.
396. Cox LA. Confronting Deep Uncertainties in Risk Analysis. *Risk Analysis* [Internet]. 1 de octubre de 2012 [citado 5 de septiembre de 2024];32(10):1607-29. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1539-6924.2012.01792.x>
397. Oehmen J, Guenther A, Herrmann JW, Schulte J, Willumsen P. RISK MANAGEMENT IN PRODUCT DEVELOPMENT: RISK IDENTIFICATION, ASSESSMENT, AND MITIGATION – A LITERATURE REVIEW. *Proceedings of the Design Society: DESIGN Conference* [Internet]. 2020 [citado 5 de septiembre de 2024];1:657-66. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-design-society-design-conference/article/risk-management-in-product->

development-risk-identification-assessment-and-mitigation-a-literature-review/737BD10A6D55576D5A813BE37D36A22E

398. Mora-román JJ, Ortiz-ureña A, Vargas-monge R. Análisis de riesgos en la industria farmacéutica : Desarrollo de un procedimiento operativo estandarizado en una empresa farmacéutica de Costa Rica. I+D Revista de Investigaciones [Internet]. 2021;16(2):85-94. Disponible en: <https://doi.org/10.33304/revinv.v16n2-2021008>
399. Charoo NA, Ali AA. Quality risk management in pharmaceutical development. Drug Dev Ind Pharm [Internet]. julio de 2013 [citado 5 de septiembre de 2024];39(7):947-60. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/sire.ub.edu/doi/abs/10.3109/03639045.2012.699065>
400. Kelley B, Cromwell M, Jerkins J. Integration of QbD risk assessment tools and overall risk management. Biologicals. 1 de septiembre de 2016;44(5):341-51.
401. Troiano G, Nolan J, Parsons D, Van Geen Hoven C, Zale S. A Quality by Design Approach to Developing and Manufacturing Polymeric Nanoparticle Drug Products. AAPS Journal [Internet]. 1 de noviembre de 2016 [citado 5 de septiembre de 2024];18(6):1354-65. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-016-9969-z>
402. Gurba-Bryśkiewicz L, Maruszak W, Smuga DA, Dubiel K, Wieczorek M. Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DOE) as a Strategy for Tuning Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery. Biomedicines [Internet]. 1 de octubre de 2023 [citado 5 de agosto de 2024];11(10):2752. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2227-9059/11/10/2752/htm>
403. Cost Comparison - Pharmacoeconomic Review Report: Patisiran (Onpattro) - NCBI Bookshelf [Internet]. [citado 9 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549695/>
404. Sheridan C. The world's first CRISPR therapy is approved: who will receive it? Nat Biotechnol. 1 de enero de 2024;42(1):3-4.
405. Bosetti R, Jones SL. Cost-Effectiveness of Nanomedicine: Estimating the Real Size of Nano-Costs. Nanomedicine [Internet]. 1 de junio de 2019 [citado 9 de octubre de 2024];14(11):1367-70. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2217/nnm-2019-0130>
406. Egwu CO, Alope C, Onwe KT, Umoke CI, Nwafor J, Eyo RA, et al. Nanomaterials in Drug Delivery: Strengths and Opportunities in Medicine. Molecules 2024, Vol 29, Page 2584 [Internet]. 31 de mayo de 2024 [citado 9 de octubre de 2024];29(11):2584. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/11/2584/htm>
407. Tinkle S, Mcneil SE, Mühlebach S, Bawa R, Borchard G, Barenholz YC, et al. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2014 [citado 29 de septiembre de 2024];1313(1):35-56. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24673240/>

408. Joseph TM, Kar Mahapatra D, Esmaeili A, Piszczyk Ł, Hasanin MS, Kattali M, et al. Nanoparticles: Taking a Unique Position in Medicine. *Nanomaterials* 2023, Vol 13, Page 574 [Internet]. 31 de enero de 2023 [citado 1 de diciembre de 2023];13(3):574. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-4991/13/3/574/htm>
409. Bhattacharjee MsR. The Intricates of Patent in Nanotechnology. *J Surv Fish Sci* [Internet]. 10 de agosto de 2023 [citado 5 de octubre de 2024];10(3S):6698-703. Disponible en: <https://sifisheressciences.com/journal/index.php/journal/article/view/2272>
410. Bowman DM, Sylvester DJ, Marino AD. Returning to the Patent Landscapes for Nanotechnology: Assessing the Garden that It Has Grown Into. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2017 [citado 5 de octubre de 2024];1570:315-38. Disponible en: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6840-4_22
411. Ioannidis JPA, Kim BYS, Trounson A. How to design preclinical studies in nanomedicine and cell therapy to maximize the prospects of clinical translation. *Nature Biomedical Engineering* 2018 2:11 [Internet]. 8 de noviembre de 2018 [citado 7 de octubre de 2024];2(11):797-809. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41551-018-0314-y>
412. Miller MA, Gadde S, Pfirschke C, Engblom C, Sprachman MM, Kohler RH, et al. Predicting therapeutic nanomedicine efficacy using a companion magnetic resonance imaging nanoparticle. *Sci Transl Med* [Internet]. 18 de noviembre de 2015 [citado 7 de octubre de 2024];7(314). Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aac6522>
413. Metselaar JM, Lammers T. Challenges in nanomedicine clinical translation. *Drug Deliv Transl Res* [Internet]. 1 de junio de 2020 [citado 4 de diciembre de 2023];10(3):721-5. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13346-020-00740-5>
414. Chehelgerdi M, Chehelgerdi M, Allela OQB, Pecho RDC, Jayasankar N, Rao DP, et al. Progressing nanotechnology to improve targeted cancer treatment: overcoming hurdles in its clinical implementation. *Mol Cancer* [Internet]. 1 de diciembre de 2023 [citado 29 de septiembre de 2024];22(1):1-103. Disponible en: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-023-01865-0>
415. Ventola CL. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *Pharmacy and Therapeutics* [Internet]. 1 de diciembre de 2017 [citado 29 de septiembre de 2024];42(12):742. Disponible en: [/pmc/articles/PMC5720487/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/304572048/)
416. Patel DM, Patel NN, Patel JK. Nanomedicine scale-up technologies: Feasibilities and challenges. *Emerging Technologies for Nanoparticle Manufacturing* [Internet]. 23 de junio de 2021 [citado 7 de octubre de 2024];

2024];511-39. Disponible en:
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-50703-9_24

417. Reinhart AG, Osterwald A, Ringler P, Leiser Y, Lauer ME, Martin RE, et al. Investigations into mRNA Lipid Nanoparticles Shelf-Life Stability under Nonfrozen Conditions. *Mol Pharm* [Internet]. 4 de diciembre de 2023 [citado 22 de octubre de 2024];20(12):6492-503. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37975733/>
418. Zhao P, Hou X, Yan J, Du S, Xue Y, Li W, et al. Long-term storage of lipid-like nanoparticles for mRNA delivery. *Bioact Mater*. 1 de junio de 2020;5(2):358-63.
419. 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. *Journal of Controlled Release*. 1 de mayo de 2023;357:149-60.
420. 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. *Journal of Controlled Release*. 1 de enero de 2023;353:241-53.
421. Sanità G, Carrese B, Lamberti A. Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization. *Front Mol Biosci* [Internet]. 26 de noviembre de 2020 [citado 6 de septiembre de 2024];7:587012. Disponible en: www.frontiersin.org
422. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2020 20:2 [Internet]. 4 de diciembre de 2020 [citado 6 de septiembre de 2024];20(2):101-24. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41573-020-0090-8>
423. Xuan Y, Zhang W, Zhu X, Zhang S. An updated overview of some factors that influence the biological effects of nanoparticles. *Front Bioeng Biotechnol*. 30 de agosto de 2023;11:1254861.
424. Li M, Jin X, Liu T, Fan F, Gao F, Chai S, et al. Nanoparticle elasticity affects systemic circulation lifetime by modulating adsorption of apolipoprotein A-I in corona formation. *Nature Communications* 2022 13:1 [Internet]. 16 de julio de 2022 [citado 20 de octubre de 2024];13(1):1-16. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-31882-4>
425. Zalba S, ten Hagen TLM, Burgui C, Garrido MJ. Stealth nanoparticles in oncology: Facing the PEG dilemma. *Journal of Controlled Release*. 1 de noviembre de 2022;351:22-36.
426. Romberg B, Hennink WE, Storm G. Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles. *Pharm Res* [Internet]. 6 de enero de 2008 [citado 20 de octubre de 2024];25(1):55-71. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-007-9348-7>

427. Zhang J, Lin Y, Lin Z, Wei Q, Qian J, Ruan R, et al. Stimuli-Responsive Nanoparticles for Controlled Drug Delivery in Synergistic Cancer Immunotherapy. *Advanced Science* [Internet]. 1 de febrero de 2022 [citado 20 de octubre de 2024];9(5):2103444. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/advs.202103444>
428. Moghimi SM, Hunter AC, Andresen TL. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: An integrated analysis and perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 10 de febrero de 2012 [citado 20 de octubre de 2024];52(Volume 52, 2012):481-503. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134623>
429. Oak U, Khare T. Nanoparticle Functionalization: Approaches and Applications. *Nanotechnology in the Life Sciences* [Internet]. 2022 [citado 23 de octubre de 2024];157-81. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-031-10220-2_4
430. Bioscience M, Sato Y, Sakurai Y, Kajimoto K, Nakamura T, Yamada Y, et al. Innovative Technologies in Nanomedicines: From Passive Targeting to Active Targeting/From Controlled Pharmacokinetics to Controlled Intracellular Pharmacokinetics. *Macromol Biosci* [Internet]. 1 de enero de 2017 [citado 18 de septiembre de 2024];17(1):1600179. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mabi.201600179>
431. Yoo J, Park C, Yi G, Lee D, Koo H. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers* 2019, Vol 11, Page 640 [Internet]. 8 de mayo de 2019 [citado 18 de septiembre de 2024];11(5):640. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/5/640/htm>
432. Ikeda-Imafuku M, Wang LLW, Rodrigues D, Shaha S, Zhao Z, Mitragotri S. Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation. *Journal of Controlled Release*. 1 de mayo de 2022;345:512-36.
433. Golombek SK, May JN, Theek B, Appold L, Drude N, Kiessling F, et al. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Adv Drug Deliv Rev*. 1 de mayo de 2018;130:17-38.
434. Todaro B, Santi M, Todaro B, Santi M. Characterization and Functionalization Approaches for the Study of Polymeric Nanoparticles: The State of the Art in Italian Research. *Micro* 2023, Vol 3, Pages 9-21 [Internet]. 26 de diciembre de 2022 [citado 23 de octubre de 2024];3(1):9-21. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2673-8023/3/1/2/htm>
435. Chen WC, Zhang AX, Li SD. Limitations and niches of the active targeting approach for nanoparticle drug delivery. *Eur J Nanomed* [Internet]. 1 de diciembre de 2012 [citado 18 de septiembre de 2024];4(2-4):89-93. Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/ejnm-2012-0010/html>

436. Kumar Y, Sinha ASK, Nigam KDP, Dwivedi D, Sangwai JS. Functionalized nanoparticles: Tailoring properties through surface energetics and coordination chemistry for advanced biomedical applications. *Nanoscale* [Internet]. 30 de marzo de 2023 [citado 23 de octubre de 2024];15(13):6075-104. Disponible en: <https://pubs-rsc-org.sire.ub.edu/en/content/articlehtml/2023/nr/d2nr07163k>
437. Upadhyay K, Tamrakar RK, Thomas S, Kumar M. Surface functionalized nanoparticles: A boon to biomedical science. *Chem Biol Interact*. 1 de agosto de 2023;380:110537.
438. Parodi A, Molinaro R, Sushnitha M, Evangelopoulos M, Martinez JO, Arrighetti N, et al. Bio-inspired engineering of cell- and virus-like nanoparticles for drug delivery. *Biomaterials*. 1 de diciembre de 2017;147:155-68.
439. Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G, et al. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1 [Internet]. 14 de febrero de 2022 [citado 30 de enero de 2024];7(1):1-27. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41392-022-00904-4>
440. Apostolopoulos V, Bojarska J, Chai TT, Elnagdy S, Kaczmarek K, Matsoukas J, et al. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules* 2021, Vol 26, Page 430 [Internet]. 15 de enero de 2021 [citado 30 de enero de 2024];26(2):430. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/2/430/htm>
441. Wu D, Sinha N, Lee J, Sutherland BP, Halaszynski NI, Tian Y, et al. Polymers with controlled assembly and rigidity made with click-functional peptide bundles. *Nature* 2019 574:7780 [Internet]. 30 de octubre de 2019 [citado 26 de octubre de 2024];574(7780):658-62. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1683-4>
442. Oswald M, Geissler S, Goepferich A. Determination of the activity of maleimide-functionalized phospholipids during preparation of liposomes. *Int J Pharm*. 30 de noviembre de 2016;514(1):93-102.
443. Martínez-Jothar L, Doukeridou S, Schiffelers RM, Sastre Torano J, Oliveira S, van Nostrum CF, et al. Insights into maleimide-thiol conjugation chemistry: Conditions for efficient surface functionalization of nanoparticles for receptor targeting. *Journal of Controlled Release*. 28 de julio de 2018;282:101-9.
444. Mahato K, Kumar A, Purohit B, Mahapatra S, Srivastava A, Chandra P. Nanomaterial Functionalization Strategies in Bio-Interface Development for Modern Diagnostic Devices. *Biointerface Engineering: Prospects in Medical Diagnostics and Drug Delivery* [Internet]. 1 de enero de 2020 [citado 26 de octubre de 2024];195-214. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-4790-4_9
445. Bartczak D, Kanaras AG. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir* [Internet].

16 de agosto de 2011 [citado 26 de octubre de 2024];27(16):10119-23.
Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la2022177>

446. Wang Y, Zhang H, Xiao W, Liu Y, Zhou Y, He X, et al. Unmasking CSF protein corona: Effect on targeting capacity of nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 10 de mayo de 2021;333:352-61.
447. Jain P, Pawar RS, Pandey RS, Madan J, Pawar S, Lakshmi PK, et al. In-vitro in-vivo correlation (IVIVC) in nanomedicine: Is protein corona the missing link? *Biotechnol Adv*. 15 de noviembre de 2017;35(7):889-904.
448. Nierenberg D, Khaled AR, Flores O. Formation of a protein corona influences the biological identity of nanomaterials. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*. 1 de julio de 2018;23(4):300-8.
449. Kadari A, Pooja D, Gora RH, Gudem S, Kolapalli VRM, Kulhari H, et al. Design of multifunctional peptide collaborated and docetaxel loaded lipid nanoparticles for antiglioma therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1 de noviembre de 2018;132:168-79.
450. Pucci C, De Pasquale D, Marino A, Martinelli C, Lauciello S, Ciofani G. Hybrid Magnetic Nanovectors Promote Selective Glioblastoma Cell Death through a Combined Effect of Lysosomal Membrane Permeabilization and Chemotherapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 1 de julio de 2020;12(26):29037-55.
451. Arduino I, Iacobazzi RM, Riganti C, Lopodota AA, Perrone MG, Lopalco A, et al. Induced expression of P-gp and BCRP transporters on brain endothelial cells using transferrin functionalized nanostructured lipid carriers: A first step of a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Pharm*. 15 de diciembre de 2020;591.
452. Ding S, Khan AI, Cai X, Song Y, Lyu Z, Du D, et al. Overcoming blood-brain barrier transport: Advances in nanoparticle-based drug delivery strategies. *Materials Today*. 1 de julio de 2020;37:112-25.
453. McConnell EM, Ventura K, Dwyer Z, Hunt V, Koudrina A, Holahan MR, et al. In Vivo Use of a Multi-DNA Aptamer-Based Payload/Targeting System To Study Dopamine Dysregulation in the Central Nervous System. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 16 de enero de 2019 [citado 29 de julio de 2024];10(1):371-83. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30160936/>
454. Ma F, Yang L, Sun Z, Chen J, Rui X, Glass Z, et al. Neurotransmitter-derived lipidoids (NT-lipidoids) for enhanced brain delivery through intravenous injection. *Sci Adv*. 1 de julio de 2020;6(30).
455. Wu L, Huang W, Peng K, Wang Y, Chen Q, Lu B. Enhancing the stability, BBB permeability and neuroprotective activity of verbascoside in vitro using lipid nanocapsules in combination with menthol. *Food Chem*. 15 de julio de 2023;414.

456. Vijayakumar MR, Vajanthri KY, Balavigneswaran CK, Mahto SK, Mishra N, Muthu MS, et al. Pharmacokinetics, biodistribution, in vitro cytotoxicity and biocompatibility of Vitamin E TPGS coated trans resveratrol liposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1 de septiembre de 2016;145:479-91.
457. Basso J, Mendes M, Silva J, Sereno J, Cova T, Oliveira R, et al. Peptide-lipid nanoconstructs act site-specifically towards glioblastoma growth impairment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1 de octubre de 2020;155:177-89.
458. Kuo YC, Hsu CC. Anti-melanotransferrin and apolipoprotein E on doxorubicin-loaded cationic solid lipid nanoparticles for pharmacotherapy of glioblastoma multiforme. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 1 de agosto de 2017;77:10-20.
459. Ray RM, Hansen AH, Taskova M, Jandl B, Hansen J, Soemardy C, et al. Enhanced target cell specificity and uptake of lipid nanoparticles using RNA aptamers and peptides. *Beilstein journal of organic chemistry* [Internet]. 26 de abril de 2021 [citado 29 de julio de 2024];17:891-907. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33981364/>
460. Han Y, Gao C, Wang H, Sun J, Liang M, Feng Y, et al. Macrophage membrane-coated nanocarriers Co-Modified by RVG29 and TPP improve brain neuronal mitochondria-targeting and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease mice. *Bioact Mater*. 1 de febrero de 2021;6(2):529-42.
461. Accardo A, Tesauro D, Morelli G. Peptide-based targeting strategies for simultaneous imaging and therapy with nanovectors. *Polymer Journal* 2013 45:5 [Internet]. 13 de febrero de 2013 [citado 8 de marzo de 2022];45(5):481-93. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/pj2012215>
462. Oller-Salvia B, Sánchez-Navarro M, Giralt E, Teixidó M. Blood–brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chem Soc Rev* [Internet]. 22 de agosto de 2016 [citado 12 de septiembre de 2024];45(17):4690-707. Disponible en: <https://pubs-rsc-org.sire.ub.edu/en/content/articlehtml/2016/cs/c6cs00076b>
463. Andrade S, Loureiro JA, Ramalho MJ, Habib S, Singh M. Angiopep-2-Modified Nanoparticles for Brain-Directed Delivery of Therapeutics: A Review. *Polymers* 2022, Vol 14, Page 712 [Internet]. 12 de febrero de 2022 [citado 12 de septiembre de 2024];14(4):712. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/4/712/htm>
464. Díaz-Perlas C, Oller-Salvia B, Sánchez-Navarro M, Teixidó M, Giralt E. Branched BBB-shuttle peptides: chemoselective modification of proteins to enhance blood–brain barrier transport. *Chem Sci* [Internet]. 14 de noviembre de 2018 [citado 12 de septiembre de 2024];9(44):8409-15. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/sc/c8sc02415d>
465. Prades R, Oller-Salvia B, Schwarzmaier SM, Selva J, Moros M, Balbi M, et al. Applying the Retro-Enantio Approach To Obtain a Peptide Capable of

Overcoming the Blood–Brain Barrier. *Angewandte Chemie International Edition* [Internet]. 23 de marzo de 2015 [citado 12 de septiembre de 2024];54(13):3967-72. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.201411408>

466. Lee JH, Engler JA, Collawn JF, Moore BA. Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor. *Eur J Biochem* [Internet]. 1 de abril de 2001 [citado 12 de septiembre de 2024];268(7):2004-12. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1327.2001.02073.x>
467. Faissner A. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) in the glial lineage modulates neuronal excitability. *Frontiers in Network Physiology*. 13 de junio de 2023;3:1190240.
468. Chen J, Su Y, Pi S, Hu B, Mao L. The Dual Role of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 28 de mayo de 2021 [citado 29 de octubre de 2024];8:682389. Disponible en: www.frontiersin.org
469. Houimel M, Dellagi K. Peptide mimotopes of rabies virus glycoprotein with immunogenic activity. *Vaccine*. 23 de julio de 2009;27(34):4648-55.
470. Huey R, Hawthorne S, McCarron P. The potential use of rabies virus glycoprotein-derived peptides to facilitate drug delivery into the central nervous system: a mini review. *J Drug Target* [Internet]. 28 de mayo de 2017 [citado 29 de octubre de 2024];25(5):379-85. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1061186X.2016.1223676>
471. Sánchez-Navarro M, Giralt E. Peptide Shuttles for Blood–Brain Barrier Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2022, Vol 14, Page 1874 [Internet]. 5 de septiembre de 2022 [citado 30 de octubre de 2024];14(9):1874. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/9/1874/htm>
472. Sánchez-Navarro M, Teixidó M, Giralt E. Jumping Hurdles: Peptides Able to Overcome Biological Barriers. *Acc Chem Res* [Internet]. 15 de agosto de 2017 [citado 30 de octubre de 2024];50(8):1847-54. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.accounts.7b00204>
473. Oller-Salvia B, Sánchez-Navarro M, Ciudad S, Guiu M, Arranz-Gibert P, Garcia C, et al. MiniAp-4: A Venom-Inspired Peptidomimetic for Brain Delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* [Internet]. 11 de enero de 2016 [citado 12 de septiembre de 2024];55(2):572-5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26492861/>
474. Scherrer K. Primary transcripts: From the discovery of RNA processing to current concepts of gene expression - Review. *Exp Cell Res*. 15 de diciembre de 2018;373(1-2):1-33.
475. Dana H, Mahmoodi Chalbatani G, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of

- siRNA. *Int J Biomed Sci* [Internet]. 15 de junio de 2017 [citado 29 de septiembre de 2024];13(2):48. Disponible en: [/pmc/articles/PMC5542916/](#)
476. Deng Y, Wang CC, Choy KW, Du Q, Chen J, Wang Q, et al. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. *Gene*. 1 de abril de 2014;538(2):217-27.
 477. Nath U, Das S. Silence of the genes. *Resonance* 2007 12:4 [Internet]. 18 de mayo de 2007 [citado 29 de septiembre de 2024];12(4):6-18. Disponible en: <https://link-springer-com.sire.ub.edu/article/10.1007/s12045-007-0034-1>
 478. Leung RKM, Whittaker PA. RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther*. 1 de agosto de 2005;107(2):222-39.
 479. Pérez-Carrión MD, Posadas I, Ceña V. Nanoparticles and siRNA: A new era in therapeutics? *Pharmacol Res*. 1 de marzo de 2024;201:107102.
 480. Arraiano CM, Andrade JM, Domingues S, Guinote IB, Malecki M, Matos RG, et al. The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 1 de septiembre de 2010 [citado 1 de noviembre de 2024];34(5):883-923. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00242.x>
 481. Hawkins PG, Morris K V. RNA and transcriptional modulation of gene expression. *Cell Cycle* [Internet]. 1 de marzo de 2008 [citado 1 de noviembre de 2024];7(5):602-7. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.7.5.5522>
 482. Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Exp Pathol* [Internet]. 1993 [citado 1 de noviembre de 2024];74(5):417. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2002184/>
 483. Cramer P. Organization and regulation of gene transcription. *Nature* 2019 573:7772 [Internet]. 28 de agosto de 2019 [citado 1 de noviembre de 2024];573(7772):45-54. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1517-4>
 484. Morales-Becerril A, Aranda-Lara L, Isaac-Olivé K, Ocampo-García BE, Morales-ávila E. Nanocarriers for delivery of siRNA as gene silencing mediator. *EXCLI J* [Internet]. 3 de enero de 2022 [citado 29 de septiembre de 2024];21:1028. Disponible en: [/pmc/articles/PMC9441682/](#)
 485. McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Reviews Genetics* 2002 3:10 [Internet]. 1 de octubre de 2002 [citado 29 de septiembre de 2024];3(10):737-47. Disponible en: <https://www-nature-com.sire.ub.edu/articles/nrg908>
 486. Firm Focuses Operations on Gene Silencing [Internet]. [citado 1 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://www.genengnews.com/insights/firm-focuses-operations-on-gene-silencing/>

487. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004 431:7006 [Internet]. 15 de septiembre de 2004 [citado 2 de noviembre de 2024];431(7006):343-9. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature02873>
488. Suñé-Pou M, Prieto-Sánchez S, Boyero-Corral S, Moreno-Castro C, Yousfi Y El, Suñé-Negre JM, et al. Targeting splicing in the treatment of human disease. *Genes (Basel)*. 2017;8(3).
489. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Doss CGP, Lee SS. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 15 de septiembre de 2017 [citado 2 de noviembre de 2024];8:132-43. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S2162253117301907/fulltext>
490. Aigner A, Kögel D. Nanoparticle/siRNA-based therapy strategies in glioma: Which nanoparticles, which siRNAs? *Nanomedicine* [Internet]. 2018;13(1):89-103. Disponible en: <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0230>
491. Young SWS, Stenzel M, Jia-Lin Y. Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy? *Crit Rev Oncol Hematol*. 1 de febrero de 2016;98:159-69.
492. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 1 de septiembre de 2015 [citado 2 de noviembre de 2024];4(9):e252. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S2162253116300373/fulltext>
493. Sioud M. RNA interference: Story and mechanisms. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2021 [citado 2 de noviembre de 2024];2282:1-15. Disponible en: https://link-springer-com.sire.ub.edu/protocol/10.1007/978-1-0716-1298-9_1
494. Wang X, Ramat A, Simonelig M, Liu MF. Emerging roles and functional mechanisms of PIWI-interacting RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2022 24:2 [Internet]. 14 de septiembre de 2022 [citado 2 de noviembre de 2024];24(2):123-41. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41580-022-00528-0>
495. Kim YK, Han J. Nobel-winning microRNA, the micromaestro of gene silencing. *Mol Cells* [Internet]. 1 de noviembre de 2024 [citado 11 de noviembre de 2024];47(11):100123. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11532464/>
496. Crooke ST. Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther* [Internet]. 1 de abril de 2017 [citado 2 de noviembre de 2024];27(2):70-7. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/nat.2016.0656>
497. Chen S, Heendeniya SN, Le BT, Rahimizadeh K, Rabiee N, Zahra Q ul ain, et al. Splice-Modulating Antisense Oligonucleotides as Therapeutics for Inherited Metabolic Diseases. *BioDrugs* 2024 38:2 [Internet]. 22 de enero de

2024 [citado 11 de noviembre de 2024];38(2):177-203. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s40259-024-00644-7>

498. Chi X, Gatti P, Papoian T. Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics. *Drug Discov Today*. 1 de mayo de 2017;22(5):823-33.
499. Bilanges B, Stokoe D. Direct comparison of the specificity of gene silencing using antisense oligonucleotides and RNAi. *Biochemical Journal* [Internet]. 1 de junio de 2005 [citado 2 de noviembre de 2024];388(2):573-83. Disponible en: [/biochemj/article/388/2/573/93295/Direct-comparison-of-the-specificity-of-gene-silencing-using-antisense-oligonucleotides-and-rnai](https://www.biochemj.org/article/388/2/573/93295/Direct-comparison-of-the-specificity-of-gene-silencing-using-antisense-oligonucleotides-and-rnai)
500. Godinho BMDC, Khvorova A. A era dos medicamentos de ARN interferência: o panorama clínico dos fármacos para silenciamento génico. *Saúde & Tecnologia* [Internet]. 2019 [citado 2 de noviembre de 2024];(21):05-17. Disponible en: <https://journals.ipl.pt/stecnologia/article/view/536>
501. Ma CC, Wang ZL, Xu T, He ZY, Wei YQ. The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. *Biotechnol Adv*. 1 de mayo de 2020;40:107502.
502. Chancellor D, Barrett D, Nguyen-Jatkoe L, Millington S, Eckhardt F. The state of cell and gene therapy in 2023. *Molecular Therapy* [Internet]. 6 de diciembre de 2023 [citado 2 de noviembre de 2024];31(12):3376-88. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S1525001623006020/fulltext>
503. Akinc A, Maier MA, Manoharan M, Fitzgerald K, Jayaraman M, Barros S, et al. The Onpatro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nature Nanotechnology* 2019 14:12 [Internet]. 4 de diciembre de 2019 [citado 16 de septiembre de 2024];14(12):1084-7. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41565-019-0591-y>
504. Amiri A, Barreto G, Sathyapalan T, Sahebkar A. siRNA Therapeutics: Future Promise for Neurodegenerative Diseases. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 11 de noviembre de 2021 [citado 29 de septiembre de 2024];19(11):1896. Disponible en: [/pmc/articles/PMC9185778/](https://pubs.pmc.com/pmc/articles/PMC9185778/)
505. Tanna S, Doshi G, Godad A. siRNA as potential therapeutic strategy for hypertension. *Eur J Pharmacol*. 15 de abril de 2024;969.
506. Zabel MD, Mollnow L, Bender H. siRNA therapeutics for protein misfolding diseases of the central nervous system. *Methods in Molecular Biology*. 2021;2282:377-94.
507. Conniot J, Talebian S, Simões S, Ferreira L, Conde J. Revisiting gene delivery to the brain: silencing and editing. *Biomater Sci* [Internet]. 23 de febrero de 2021 [citado 2 de noviembre de 2024];9(4):1065-87. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/bm/d0bm01278e>
508. Ralph GS, Mazarakis ND, Azzouz M. Therapeutic gene silencing in neurological disorders, using interfering RNA. *J Mol Med* [Internet]. 10 de

junio de 2005 [citado 3 de noviembre de 2024];83(6):413-9. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-005-0649-1>

509. Kay C, Skotte NH, Southwell AL, Hayden MR. Personalized gene silencing therapeutics for Huntington disease. *Clin Genet* [Internet]. 1 de julio de 2014 [citado 3 de noviembre de 2024];86(1):29-36. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cge.12385>
510. Singh J, Khan M, Singh I. Silencing of Abcd1 and Abcd2 genes sensitizes astrocytes for inflammation: Implication for X-adrenoleukodystrophy. *J Lipid Res* [Internet]. 1 de enero de 2009 [citado 3 de noviembre de 2024];50(1):135-47. Disponible en:
<http://www.jlr.org/article/S002227520414774/fulltext>
511. Imran Sajid M, Sultan Sheikh F, Anis F, Nasim N, Sumbria RK, Nauli SM, et al. siRNA drug delivery across the blood–brain barrier in Alzheimer’s disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 1 de agosto de 2023;199:114968.
512. Rehman S, Nabi B, Potttoo FH, Baboota S, Ali J. Nanoparticle Based Gene Therapy Approach: A Pioneering Rebellion in the Management of Psychiatric Disorders. *Curr Gene Ther*. 7 de junio de 2020;20(3):164-73.
513. Jia Y, Zhuang X, Zhang Y, Zhao M, Chen N, Li W, et al. The brain targeted delivery of programmed cell death 4 specific siRNA protects mice from CRS-induced depressive behavior. *Cell Death & Disease* 2021 12:11 [Internet]. 12 de noviembre de 2021 [citado 3 de noviembre de 2024];12(11):1-11. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41419-021-04361-9>
514. O’Connor RM, Thakker DR, Schmutz M, Van Der Putten H, Hoyer D, Flor PJ, et al. Adult siRNA-induced knockdown of mGlu7 receptors reduces anxiety in the mouse. *Neuropharmacology*. 1 de septiembre de 2013;72:66-73.
515. Artigas F, Bortolozzi A. Therapeutic Potential of Conjugated siRNAs for the Treatment of Major Depressive Disorder. *Neuropsychopharmacology* 2017 42:1 [Internet]. 2 de diciembre de 2016 [citado 3 de noviembre de 2024];42(1):371-2. Disponible en:
<https://www.nature.com/articles/npp2016182>
516. Noori-Dalooi MR, Mojarrad M, Rashidi-Nezhad A, Kheirollahi M, Shahbazi A, Khaksari M, et al. Use of siRNA in knocking down of dopamine receptors, a possible therapeutic option in neuropsychiatric disorders. *Mol Biol Rep* [Internet]. 3 de febrero de 2012 [citado 3 de noviembre de 2024];39(2):2003-10. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-011-0947-3>
517. Gomes MJ, Martins S, Sarmiento B. siRNA as a tool to improve the treatment of brain diseases: Mechanism, targets and delivery. *Ageing Res Rev*. 1 de mayo de 2015;21:43-54.
518. Karlsson J, Rui Y, Kozielski KL, Placone AL, Choi O, Tzeng SY, et al. Engineered nanoparticles for systemic siRNA delivery to malignant brain tumours. *Nanoscale*. 14 de noviembre de 2019;11(42):20045-57.

519. Seo YE, Suh HW, Bahal R, Josowitz A, Zhang J, Song E, et al. Nanoparticle-mediated intratumoral inhibition of miR-21 for improved survival in glioblastoma. *Biomaterials*. 1 de mayo de 2019;201:87-98.
520. Wei L, Guo XY, Yang T, Yu MZ, Chen DW, Wang JC. Brain tumor-targeted therapy by systemic delivery of siRNA with Transferrin receptor-mediated core-shell nanoparticles. *Int J Pharm*. 20 de agosto de 2016;510(1):394-405.
521. Jiang X, Tan J, Wen Y, Liu W, Wu S, Wang L, et al. MSI2-TGF- β /TGF- β R1/SMAD3 positive feedback regulation in glioblastoma. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 1 de agosto de 2019 [citado 3 de noviembre de 2024];84(2):415-25. Disponible en: <https://link-springer-com.sire.ub.edu/article/10.1007/s00280-019-03892-5>
522. Yang Z, Xiang B, Dong D, Wang Z, Li J, Qi X. Dual Receptor-Specific Peptides Modified Liposomes as VEGF siRNA Vector for Tumor-Targeting Therapy.
523. Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS. Downregulation of uPA, uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth. *Neuron Glia Biol* [Internet]. 2004 [citado 3 de noviembre de 2024];1(2):165-76. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/neuron-glia-biology/article/abs/downregulation-of-upa-upar-and-mmp9-using-small-interfering-hairpin-rna-sirna-inhibits-glioma-cell-invasion-angiogenesis-and-tumor-growth/C8E2A13B0C46C521DF212DF9C5A8FC8A>
524. Xu Q, Yuan X, Liu G, Black KL, Yu JS. Hedgehog Signaling Regulates Brain Tumor-Initiating Cell Proliferation and Portends Shorter Survival for Patients with PTEN-Coexpressing Glioblastomas. *Stem Cells* [Internet]. 1 de diciembre de 2008 [citado 3 de noviembre de 2024];26(12):3018-26. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2008-0459>
525. Pu P, Zhang Z, Kang C, Jiang R, Jia Z, Wang G, et al. Downregulation of Wnt2 and β -catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth. *Cancer Gene Therapy* 2009 16:4 [Internet]. 24 de octubre de 2008 [citado 3 de noviembre de 2024];16(4):351-61. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/cgt200878>
526. Maguire CA, Ramirez SH, Merkel SF, Sena-Esteves M, Breakefield XO. Gene Therapy for the Nervous System: Challenges and New Strategies. *Neurotherapeutics*. 1 de octubre de 2014;11(4):817-39.
527. David S, Pitard B, Benoît JP, Passirani C. Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. *Pharmacol Res*. 1 de agosto de 2010;62(2):100-14.
528. Tam Y, Chen S, Cullis P. Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery. *Pharmaceutics* [Internet]. 18 de septiembre de 2013 [citado 3 de febrero de 2021];5(4):498-507. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1999-4923/5/3/498>
529. Kulkarni JA, Witzigmann D, Chen S, Cullis PR, Van Der Meel R. Lipid Nanoparticle Technology for Clinical Translation of siRNA Therapeutics. *Acc*

- Chem Res [Internet]. 17 de septiembre de 2019 [citado 24 de febrero de 2021];52(9):2435-44. Disponible en: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
530. Ilić T, Đoković JB, Nikolić I, Mitrović JR, Pantelić I, Savić SD, et al. Parenteral Lipid-Based Nanoparticles for CNS Disorders: Integrating Various Facets of Preclinical Evaluation towards More Effective Clinical Translation. *Pharmaceutics* 2023, Vol 15, Page 443 [Internet]. 29 de enero de 2023 [citado 9 de julio de 2024];15(2):443. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/2/443/htm>
 531. Wan C, Allen TM, Cullis PR. Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. *Drug Delivery and Translational Research* 2013 4:1 [Internet]. 28 de junio de 2013 [citado 4 de noviembre de 2024];4(1):74-83. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13346-013-0161-z>
 532. Cardoso ALC, Simões S, de Almeida LP, Pelisek J, Culmsee C, Wagner E, et al. siRNA delivery by a transferrin-associated lipid-based vector: a non-viral strategy to mediate gene silencing. *J Gene Med* [Internet]. 1 de marzo de 2007 [citado 4 de noviembre de 2024];9(3):170-83. Disponible en: <https://onlinelibrary-wiley-com.sire.ub.edu/doi/full/10.1002/jgm.1006>
 533. Liu S, Liu J, Li H, Mao K, Wang H, Meng X, et al. An optimized ionizable cationic lipid for brain tumor-targeted siRNA delivery and glioblastoma immunotherapy. *Biomaterials*. 1 de agosto de 2022;287.
 534. Habrant D, Peuziat P, Colombani T, Dallet L, Gehin J, Goudeau E, et al. Design of Ionizable Lipids to Overcome the Limiting Step of Endosomal Escape: Application in the Intracellular Delivery of mRNA, DNA, and siRNA. *J Med Chem* [Internet]. 28 de abril de 2016 [citado 4 de noviembre de 2024];59(7):3046-62. Disponible en: <https://pubs-ac-sire.ub.edu/doi/full/10.1021/acs.jmedchem.5b01679>
 535. Hagedorn L, Jürgens DC, Merkel OM, Winkeljann B. Endosomal escape mechanisms of extracellular vesicle-based drug carriers: lessons for lipid nanoparticle design. *Extracell Vesicles Circ Nucleic Acids* 2024;5:344-57 [Internet]. 5 de julio de 2024 [citado 4 de noviembre de 2024];5(3):344-57. Disponible en: <https://www.oaepublish.com/articles/evcna.2024.19>
 536. Shankar R, Joshi M, Pathak K. Lipid Nanoparticles: A Novel Approach for Brain Targeting. *Pharm Nanotechnol*. 30 de julio de 2018;6(2):81-93.
 537. Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, et al. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One* [Internet]. 17 de junio de 2014 [citado 25 de septiembre de 2024];9(6). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24936790/>
 538. Correia AC, Moreira JN, Sousa Lobo JM, Silva AC. Design of experiment (DoE) as a quality by design (QbD) tool to optimise formulations of lipid nanoparticles for nose-to-brain drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2 de diciembre de 2023 [citado 28 de agosto de 2024];19(12):1711-24. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/articleabstract/C9MD00056A>

- 2024];20(12):1731-48. Disponible en: <https://www-tandfonline-com.sire.ub.edu/doi/abs/10.1080/17425247.2023.2274902>
539. Pozzi D, Caracciolo G. Looking Back, Moving Forward: Lipid Nanoparticles as a Promising Frontier in Gene Delivery. *ACS Pharmacol Transl Sci* [Internet]. 10 de noviembre de 2023 [citado 28 de agosto de 2024];6(11):1561-73. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsptsci.3c00185>
 540. Strelkova Petersen DM, Chaudhary N, Arral ML, Weiss RM, Whitehead KA. The mixing method used to formulate lipid nanoparticles affects mRNA delivery efficacy and organ tropism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1 de noviembre de 2023;192:126-35.
 541. 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. *Pharmaceutics* [Internet]. 1 de noviembre de 2023 [citado 28 de agosto de 2024];16(11):1583. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/11/1583/htm>
 542. Kawasaki H, Shimanouchi T, Kimura Y. Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. *J Chem* [Internet]. 1 de enero de 2019 [citado 28 de agosto de 2024];2019(1):9502856. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2019/9502856>
 543. Jia Z, Li J, Gao L, Yang D, Kanaev A. Dynamic Light Scattering: A Powerful Tool for In Situ Nanoparticle Sizing. *Colloids and Interfaces 2023, Vol 7, Page 15* [Internet]. 16 de febrero de 2023 [citado 29 de agosto de 2024];7(1):15. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2504-5377/7/1/15/htm>
 544. Filippov SK, Khusnutdinov R, Murmiliuk A, Inam W, Zakharova LY, Zhang H, et al. Dynamic light scattering and transmission electron microscopy in drug delivery: a roadmap for correct characterization of nanoparticles and interpretation of results. *Mater Horiz* [Internet]. 27 de noviembre de 2023 [citado 29 de agosto de 2024];10(12):5354-70. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2023/mh/d3mh00717k>
 545. Rodríguez-Loya J, Lerma M, Gardea-Torresdey JL. Dynamic Light Scattering and Its Application to Control Nanoparticle Aggregation in Colloidal Systems: A Review. *Micromachines* 2024, Vol 15, Page 24 [Internet]. 22 de diciembre de 2023 [citado 29 de agosto de 2024];15(1):24. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-666X/15/1/24/htm>
 546. Kincses A, Santa-Maria AR, Walter FR, Dér L, Horányi N, Lipka D V., et al. A chip device to determine surface charge properties of confluent cell monolayers by measuring streaming potential. *Lab Chip* [Internet]. 13 de octubre de 2020 [citado 6 de septiembre de 2024];20(20):3792-805. Disponible en: <https://pubs-rsc-org.sire.ub.edu/en/content/articlehtml/2020/lc/d0lc00558d>

547. Pate K, Safier P. Chemical metrology methods for CMP quality. *Advances in Chemical Mechanical Planarization (CMP)*. 1 de enero de 2016;299-325.
548. Serrano-Lotina A, Portela R, Baeza P, Alcolea-Rodriguez V, Villarroel M, Ávila P. Zeta potential as a tool for functional materials development. *Catal Today*. 1 de noviembre de 2023;423:113862.
549. Lunardi CN, Gomes AJ, Rocha FS, De Tommaso J, Patience GS. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. *Can J Chem Eng [Internet]*. 1 de marzo de 2021 [citado 29 de agosto de 2024];99(3):627-39. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cjce.23914>
550. Amelinckx S, Van Landuyt J. Transmission Electron Microscopy. *Encyclopedia of Physical Science and Technology [Internet]*. 1 de enero de 2003 [citado 29 de agosto de 2024];53-87. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122274105007894>
551. Smith JR, Olusanya TOB, Lamprou DA. Characterization of drug delivery vehicles using atomic force microscopy: current status. *Expert Opin Drug Deliv [Internet]*. 2 de diciembre de 2018 [citado 29 de agosto de 2024];15(12):1211-21. Disponible en: <https://www.tandfonline-com.sire.ub.edu/doi/abs/10.1080/17425247.2018.1546693>
552. Dubes A, Parrot-Lopez H, Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H, Shahgaldian P, et al. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1 de mayo de 2003;55(3):279-82.
553. Roose-Amsaleg C, Fedala Y, Vénien-Bryan C, Garnier J, Boccara AC, Boccara M. Utilization of interferometric light microscopy for the rapid analysis of virus abundance in a river. *Res Microbiol*. 1 de junio de 2017;168(5):413-8.
554. Turkki V, Alppila E, Ylä-Herttuala S, Lesch HP. Experimental Evaluation of an Interferometric Light Microscopy Particle Counter for Titering and Characterization of Virus Preparations. *Viruses* 2021, Vol 13, Page 939 [Internet]. 19 de mayo de 2021 [citado 29 de agosto de 2024];13(5):939. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/5/939/html>
555. Aygun U, Urey H, Yalcin Ozkumur A. Label-free detection of nanoparticles using depth scanning correlation interferometric microscopy. *Scientific Reports* 2019 9:1 [Internet]. 21 de junio de 2019 [citado 6 de septiembre de 2024];9(1):1-8. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-45439-x>
556. Bizmark N, Nayagam S, Kim B, Amelemah DF, Zhang D, Datta SS, et al. Ribogreen Fluorescent Assay Kinetics to Measure Ribonucleic Acid Loading into Lipid Nanoparticle Carriers. *Adv Mater Interfaces [Internet]*. 1 de junio de 2024 [citado 29 de agosto de 2024];11(17):2301083. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/admi.202301083>

557. Jones LJ, Yue ST, Cheung CY, Singer VL. RNA Quantitation by Fluorescence-Based Solution Assay: RiboGreen Reagent Characterization. *Anal Biochem.* 15 de diciembre de 1998;265(2):368-74.
558. Liu FK. Analysis and applications of nanoparticles in the separation sciences: A case of gold nanoparticles. *J Chromatogr A.* 25 de diciembre de 2009;1216(52):9034-47.
559. Mousli Y, Brachet M, Chain JL, Ferey L. A rapid and quantitative reversed-phase HPLC-DAD/ELSD method for lipids involved in nanoparticle formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 25 de octubre de 2022;220:115011.
560. Lowenthal MS, Antonishek AS, Phinney KW. Quantification of mRNA in Lipid Nanoparticles Using Mass Spectrometry. *Anal Chem* [Internet]. 23 de enero de 2024 [citado 29 de agosto de 2024];96(3):1214-22. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.analchem.3c04406>
561. Robotham AC, Kelly JF. Detection and quantification of free sulfhydryls in monoclonal antibodies using maleimide labeling and mass spectrometry. *MAbs* [Internet]. 19 de mayo de 2019 [citado 29 de agosto de 2024];11(4):757. Disponible en: [/pmc/articles/PMC6601545/](https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsma.3b00154)
562. Mazzocchi A, Yoo KM, Nairon KG, Kirk LM, Rahbar E, Soker S, et al. Exploiting maleimide-functionalized hyaluronan hydrogels to test cellular responses to physical and biochemical stimuli. *Biomedical Materials* [Internet]. 13 de enero de 2022 [citado 29 de agosto de 2024];17(2):025001. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-605X/ac45eb>
563. Sigma Aldrich. Fluorometric Maleimide Assay Kit Product Description [Internet]. 2022 [citado 30 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/297/858/mak167pis-mk.pdf>
564. Guba A, Bába O, Tózsér J, Csósz É, Kalló G. Fast and Sensitive Quantification of AccQ-Tag Derivatized Amino Acids and Biogenic Amines by UHPLC-UV Analysis from Complex Biological Samples. *Metabolites* [Internet]. 1 de marzo de 2022 [citado 30 de agosto de 2024];12(3):272. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-1989/12/3/272/htm>
565. Jiang X, Lu C, Tang M, Yang Z, Jia W, Ma Y, et al. Nanotoxicity of Silver Nanoparticles on HEK293T Cells: A Combined Study Using Biomechanical and Biological Techniques. *ACS Omega* [Internet]. 30 de junio de 2018 [citado 30 de agosto de 2024];3(6):6770-8. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.8b00608>
566. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp* [Internet]. 17 de febrero de 2016 [citado 19 de septiembre de 2024];2016(108):53193. Disponible en: [/pmc/articles/PMC4828168/](https://www.jove.com/video/53193)
567. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in Molecular Biology*

- [Internet]. 2013 [citado 19 de septiembre de 2024];1078:9-21. Disponible en: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-640-5_2
568. Qi D, Lin H, Hu B, Wei Y. A review on in vitro model of the blood-brain barrier (BBB) based on hCMEC/D3 cells. *Journal of Controlled Release*. 1 de junio de 2023;358:78-97.
 569. Weksler B, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS* [Internet]. 26 de marzo de 2013 [citado 30 de agosto de 2024];10(1):1-10. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/2045-8118-10-16>
 570. Confocal Microscopes - Institute for Molecular Bioscience - University of Queensland [Internet]. [citado 7 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://imb.uq.edu.au/facilities/microscopy/hardware-software/confocal-microscopes>
 571. Jonkman J, Brown CM, Wright GD, Anderson KI, North AJ. Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. *Nature Protocols* 2020 15:5 [Internet]. 31 de marzo de 2020 [citado 7 de septiembre de 2024];15(5):1585-611. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41596-020-0313-9>
 572. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom* [Internet]. 1 de marzo de 2020 [citado 7 de septiembre de 2024];92(1):e68. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpcy.68>
 573. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 17 de febrero de 2017 [citado 7 de septiembre de 2024];37(2):163-76. Disponible en: <https://www-tandfonline-com.sire.ub.edu/doi/abs/10.3109/07388551.2015.1128876>
 574. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. 1 de enero de 2018 [citado 7 de septiembre de 2024];120(1):5.1.1-5.1.11. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpim.40>
 575. Meftahi GH, Bahari Z, Zarei Mahmoudabadi A, Iman M, Jangravi Z. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [Internet]. 1 de julio de 2021 [citado 30 de agosto de 2024];49(4):509-17. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bmb.21516>
 576. Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem*. 15 de marzo de 2020;593:113608.
 577. Waterborg JH. The Lowry Method for Protein Quantitation. 2009 [citado 26 de septiembre de 2024];7-10. Disponible en: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-198-7_2

578. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [Internet]. 1 de septiembre de 2021 [citado 30 de agosto de 2024];49(5):800-12. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bmb.21552>
579. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1 de mayo de 2001 [citado 2 de octubre de 2024];29(9):e45-e45. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
580. Zhang M, Gu L, Zheng P, Chen Z, Dou X, Qin Q, et al. Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 1 de enero de 2020 [citado 31 de agosto de 2024];34(1):e23024. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcla.23024>
581. Camacho-Fernández C, Hervás D, Rivas-Sendra A, Marín MP, Seguí-Simarro JM. Comparison of six different methods to calculate cell densities. *Plant Methods* [Internet]. 16 de abril de 2018 [citado 31 de agosto de 2024];14(1):1-15. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13007-018-0297-4>
582. Giuliani A. The application of principal component analysis to drug discovery and biomedical data. *Drug Discov Today*. 1 de julio de 2017;22(7):1069-76.
583. Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. Classification and regression trees. *Classification and Regression Trees* [Internet]. 1 de enero de 1984 [citado 13 de octubre de 2022];1-358. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781315139470/classification-regression-trees-leo-breiman>
584. Procediment de gestió de residus especials – Oficina de Seguretat, Salut i Medi Ambient [Internet]. [citado 1 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://www.ub.edu/ossma/medi-ambient/residus-especials/procediment-gestio-residus-especials>
585. Maeki M, Okada Y, Uno S, Sugiura K, Suzuki Y, Okuda K, et al. Mass production system for RNA-loaded lipid nanoparticles using piling up microfluidic devices. *Appl Mater Today*. 1 de abril de 2023;31:101754.
586. Carrillo C, Suñé JM, Pérez-Lozano P, García-Montoya E, Sarrate R, Fàbregas A, et al. Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery systems: Determination of loading efficiency. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2014;68(6):775-83.
587. A. Fàbregasa,b,*, M. Miñarroa,bA. Fàbregasa,b,*, M. Miñarroa,b, E. García-Montoyaa,b, P. Pérez-Lozanoa,b, C. Carrilloa, R. Sarratea, N. Sáncheza, J.R. Ticóa,b, J.M. Suñé-Negrea, E. García-Montoyaa,b, P. Pérez-Lozanoa,b, C. Carrilloa, R. Sarratea, N. Sá JMSN. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. 2013;

588. 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.
589. 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 Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2019;180:159-67. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.037>
590. Fàbregas A, Sánchez-Hernández N, Ticó 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. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.022>
591. Carrillo C, Sánchez-Hernández N, García-Montoya E, Pérez-Lozano P, Suñé-Negre JM, Ticó JR, et al. DNA delivery via cationic solid lipid nanoparticles (SLNs). *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2013;49(2):157-65. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.02.011>
592. Yi Xue H, Guo P, Wen WC, Lun Wong H. Lipid-Based Nanocarriers for RNA Delivery. *Curr Pharm Des*. 21(22):3140-7.
593. Zhang W, Jiang Y, He Y, Boucetta H, Wu J, Chen Z, et al. Lipid carriers for mRNA delivery. *Acta Pharm Sin B*. 1 de octubre de 2023;13(10):4105-26.
594. Zhou Y, Zhu F, Liu Y, Zheng M, Wang Y, Zhang D, et al. Blood-brain barrier-penetrating siRNA nanomedicine for Alzheimer's disease therapy. *Sci Adv* [Internet]. 7 de octubre de 2020 [citado 14 de septiembre de 2024];6(41). Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abc7031>
595. Zhou Y, Zhang C, Liang W. Development of RNAi technology for targeted therapy — A track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. *Journal of Controlled Release*. 10 de noviembre de 2014;193:270-81.
596. Badri P, Habtemariam B, Melch M, Clausen VA, Arum S, Li X, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Patisiran in Patients with hATTR Amyloidosis and with Polyneuropathy After Liver Transplantation. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 1 de octubre de 2023 [citado 16 de septiembre de 2024];62(10):1509-22. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40262-023-01292-w>
597. Zhang X, Goel V, Robbie GJ. Pharmacokinetics of Patisiran, the First Approved RNA Interference Therapy in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *The Journal of Clinical Pharmacology* [Internet]. 1 de mayo de 2020 [citado 16 de septiembre de 2024];60(5):573-

85. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcph.1553>

598. Kristen A V., Ajroud-Driss S, Conceição I, Gorevic P, Kyriakides T, Obici L. Patisiran, an RNAi Therapeutic for the Treatment of Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *Neurodegener Dis Manag* [Internet]. 1 de febrero de 2019 [citado 16 de septiembre de 2024];9(1):5-23. Disponible en: <https://www.tandfonline-com.sire.ub.edu/doi/abs/10.2217/nmt-2018-0033>
599. Suzuki Y, Ishihara H. Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*. 1 de diciembre de 2021;41:100424.
600. Urits I, Swanson D, Swett MC, Patel A, Berardino K, Amgalan A, et al. A Review of Patisiran (ONPATRO®) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurol Ther* [Internet]. 1 de diciembre de 2020 [citado 16 de septiembre de 2024];9(2):301-15. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40120-020-00208-1>
601. Lee JH, Han JP. In vivo LNP-CRISPR Approaches for the Treatment of Hemophilia. *Mol Diagn Ther* [Internet]. 1 de mayo de 2024 [citado 16 de septiembre de 2024];28(3):239. Disponible en: </pmc/articles/PMC11068834/>
602. Breathing new life into in vivo lung editing. *Nature Biotechnology* 2024 42:7 [Internet]. 8 de julio de 2024 [citado 16 de septiembre de 2024];42(7):993-4. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41587-024-02338-5>
603. Kazemian P, Yu SY, Thomson SB, Birkenshaw A, Leavitt BR, Ross CJD. Lipid-Nanoparticle-Based Delivery of CRISPR/Cas9 Genome-Editing Components. *Mol Pharm* [Internet]. 6 de junio de 2022 [citado 16 de septiembre de 2024];19(6):1669. Disponible en: </pmc/articles/PMC9176214/>
604. Hirakawa MP, Krishnakumar R, Timlin JA, Carney JP, Butler KS. Gene editing and CRISPR in the clinic: Current and future perspectives. *Biosci Rep* [Internet]. 1 de abril de 2020 [citado 16 de septiembre de 2024];40(4). Disponible en: </bioscierep/article/40/4/BSR20200127/222452/Gene-editing-and-CRISPR-in-the-clinic-current-and>
605. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med* [Internet]. 1 de mayo de 2018 [citado 16 de septiembre de 2024];20(5):e3015. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jgm.3015>
606. Kastner E, Kaur R, Lowry D, Moghaddam B, Wilkinson A, Perrie Y. High-throughput manufacturing of size-tuned liposomes by a new microfluidics method using enhanced statistical tools for characterization. *Int J Pharm*. 30 de diciembre de 2014;477(1-2):361-8.

607. Okuda K, Sato Y, Iwakawa K, Sasaki K, Okabe N, Maeki M, et al. On the size-regulation of RNA-loaded lipid nanoparticles synthesized by microfluidic device. *Journal of Controlled Release*. 1 de agosto de 2022;348:648-59.
608. Schober GB, Story S, Arya DP. A careful look at lipid nanoparticle characterization: analysis of benchmark formulations for encapsulation of RNA cargo size gradient. *Scientific Reports* 2024 14:1 [Internet]. 29 de enero de 2024 [citado 17 de septiembre de 2024];14(1):1-10. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-52685-1>
609. Flühmann B, Ntai I, Borchard G, Simoens S, Mühlebach S. Nanomedicines: The magic bullets reaching their target? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1 de febrero de 2019;128:73-80.
610. Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer* 2008 8:6 [Internet]. 12 de mayo de 2008 [citado 18 de septiembre de 2024];8(6):473-80. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc2394>
611. Hendricks WPD, Yang J, Sur S, Zhou S. Formulating the magic bullet: Barriers to clinical translation of nanoparticle cancer gene therapy. *Nanomedicine* [Internet]. 2014 [citado 18 de septiembre de 2024];9(8):1121-4. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2217/nnm.14.63>
612. Li J, Wang Q, Xia G, Adilijiang N, Li Y, Hou Z, et al. Recent Advances in Targeted Drug Delivery Strategy for Enhancing Oncotherapy. *Pharmaceutics* 2023, Vol 15, Page 2233 [Internet]. 29 de agosto de 2023 [citado 18 de septiembre de 2024];15(9):2233. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/9/2233/htm>
613. Stylianopoulos T, Jain RK. Design considerations for nanotherapeutics in oncology. *Nanomedicine*. 1 de noviembre de 2015;11(8):1893-907.
614. Bazak R, Hourri M, El Achy S, Kamel S, Refaat T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 11 de abril de 2015 [citado 18 de septiembre de 2024];141(5):769-84. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00432-014-1767-3>
615. Hong L, Li W, Li Y, Yin S. Nanoparticle-based drug delivery systems targeting cancer cell surfaces. *RSC Adv* [Internet]. 17 de julio de 2023 [citado 18 de septiembre de 2024];13(31):21365-82. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2023/ra/d3ra02969g>
616. Shi P, Cheng Z, Zhao K, Chen Y, Zhang A, Gan W, et al. Active targeting schemes for nano-drug delivery systems in osteosarcoma therapeutics. *Journal of Nanobiotechnology* 2023 21:1 [Internet]. 22 de marzo de 2023 [citado 18 de septiembre de 2024];21(1):1-27. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12951-023-01826-1>

617. Chen Z, Kankala RK, Long L, Xie S, Chen A, Zou L. Current understanding of passive and active targeting nanomedicines to enhance tumor accumulation. *Coord Chem Rev.* 15 de abril de 2023;481:215051.
618. Teixeira MI, Lopes CM, Amaral MH, Costa PC. Surface-modified lipid nanocarriers for crossing the blood-brain barrier (BBB): A current overview of active targeting in brain diseases. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 de enero de 2023;221:112999.
619. Guyon L, Groo AC, Malzert-Fréon A. Relevant Physicochemical Methods to Functionalize, Purify, and Characterize Surface-Decorated Lipid-Based Nanocarriers. *Mol Pharm [Internet].* 4 de enero de 2020 [citado 2 de febrero de 2021];18:44-64. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00857>
620. McCully M, Sanchez-Navarro M, Teixido M, Giralt E. Peptide Mediated Brain Delivery of Nano- and Submicroparticles: A Synergistic Approach. *Curr Pharm Des.* 28 de febrero de 2018;24(13):1366-76.
621. Díaz-Perlas C, Varese M, Guardiola S, García J, Sánchez-Navarro M, Giralt E, et al. From venoms to BBB-shuttles. MiniCTX3: a molecular vector derived from scorpion venom. *Chemical Communications [Internet].* 8 de noviembre de 2018 [citado 18 de septiembre de 2024];54(90):12738-41. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/cc/c8cc06725b>
622. Gober IN, Riemen AJ, Villain M. Sequence sensitivity and pH dependence of maleimide conjugated N-terminal cysteine peptides to thiazine rearrangement. *Journal of Peptide Science [Internet].* 1 de julio de 2021 [citado 18 de septiembre de 2024];27(7):e3323. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/psc.3323>
623. David Narváez Narváez. Pegilación y liofilización de nanopartículas sólidas lipídicas con colesteril oleato como vectores de ácidos nucleicos (Tesis Doctoral). [Barcelona]: Universidad de Barcelona; 2024.
624. Dekevic G, Tasto L, Czermak P, Salzig D. Statistical experimental designs to optimize the transient transfection of HEK 293T cells and determine a transfer criterion from adherent cells to larger-scale cell suspension cultures. *J Biotechnol.* 20 de febrero de 2022;346:23-34.
625. Williams S. Design of Gold Nanoparticle Mediated siRNA Anti-cancer Therapies (Tesis Doctoral) [Internet]. University of Southern Mississippi ; 2012 [citado 19 de septiembre de 2024]. Disponible en: https://aquila.usm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1070&context=honors_theses
626. Pretto C, Van Hest JCM. Versatile Reversible Cross-Linking Strategy to Stabilize CCMV Virus like Particles for Efficient siRNA Delivery. *Bioconjug Chem [Internet].* 18 de diciembre de 2019 [citado 19 de septiembre de 2024];30(12):3069-77. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.bioconjchem.9b00731>

627. Keam SP, Hutvagner G, Ribas De Pouplana L, Torres AG. tRNA-Derived Fragments (tRFs): Emerging New Roles for an Ancient RNA in the Regulation of Gene Expression. *Life* 2015, Vol 5, Pages 1638-1651 [Internet]. 27 de noviembre de 2015 [citado 19 de septiembre de 2024];5(4):1638-51. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2075-1729/5/4/1638/htm>
628. Pons M, Prieto S, Miguel L, Frebourg T, Campion D, Suñé C, et al. Identification of TCERG1 as a new genetic modulator of TDP-43 production in *Drosophila*. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 12 de diciembre de 2018 [citado 19 de septiembre de 2024];6(1):138. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s40478-018-0639-5>
629. Muñoz-Cobo JP, Sánchez-Hernández N, Gutiérrez S, El Yousfi Y, Montes M, Gallego C, et al. Transcriptional Elongation Regulator 1 Affects Transcription and Splicing of Genes Associated with Cellular Morphology and Cytoskeleton Dynamics and Is Required for Neurite Outgrowth in Neuroblastoma Cells and Primary Neuronal Cultures. *Mol Neurobiol* [Internet]. 1 de diciembre de 2017 [citado 19 de septiembre de 2024];54(10):7808-23. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-016-0284-6>
630. Sivandzade F, Cucullo L. In-vitro blood–brain barrier modeling: A review of modern and fast-advancing technologies. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2018;38(10):1667-81.
631. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* [Internet]. 11 de febrero de 2015 [citado 20 de septiembre de 2024];36(5):862-90. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0271678X16630991>
632. Müller J, Ezzo K, Dargó G, Könczöl Á, Balogh GT. Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 15 de noviembre de 2015;79:53-60.
633. Shah B, Dong X. Current Status of In Vitro Models of the Blood-Brain Barrier. *Curr Drug Deliv* [Internet]. 4 de marzo de 2022 [citado 26 de julio de 2024];19(10):1034-46. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35111111/>
634. Banerjee J, Shi Y, Azevedo HS. In vitro blood–brain barrier models for drug research: state-of-the-art and new perspectives on reconstituting these models on artificial basement membrane platforms. Vol. 21, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2016. p. 1367-86.
635. Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD, et al. In vitro models for the blood–brain barrier. *Toxicology in Vitro*. 1 de abril de 2005;19(3):299-334.
636. Ruck T, Bittner S, Meuth SG. Blood-brain barrier modeling: Challenges and perspectives. *Neural Regen Res* [Internet]. 1 de junio de 2015 [citado 20 de septiembre de 2024];10(6):889-91. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26011111/>

https://journals.lww.com/nrronline/fulltext/2015/10060/blood_brain_barrier_modeling_challenges_and.14.aspx

637. Mutiarahmi CN, Hartady T, Lesmana R. USE OF MICE AS EXPERIMENTAL ANIMALS IN LABORATORIES THAT REFER TO THE PRINCIPLES OF ANIMAL WELFARE: A LITERATURE REVIEW. *Indonesia Medicus Veterinus*. 31 de enero de 2021;10(1):134-45.
638. Charles Aske K, Courtney &, Waugh A. Expanding the 3R principles. *EMBO Rep* [Internet]. 25 de julio de 2017 [citado 20 de septiembre de 2024];18(9):1490-2. Disponible en: <https://www.embopress.org/doi/10.15252/embr.201744428>
639. Liu GW, Pippin JW, Eng DG, Lv S, Shankland SJ, Pun SH. Nanoparticles exhibit greater accumulation in kidney glomeruli during experimental glomerular kidney disease. *Physiol Rep* [Internet]. 1 de agosto de 2020 [citado 21 de septiembre de 2024];8(15):e14545. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.14814/phy2.14545>
640. Choi CHJ, Zuckerman JE, Webster P, Davis ME. Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 19 de abril de 2011 [citado 21 de septiembre de 2024];108(16):6656-61. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1103573108>
641. Huang Y, Wang J, Jiang K, Chung EJ. Improving kidney targeting: The influence of nanoparticle physicochemical properties on kidney interactions. *Journal of Controlled Release*. 10 de junio de 2021;334:127-37.
642. Li R, Eun JS, Lee MK. Pharmacokinetics and biodistribution of paclitaxel loaded in pegylated solid lipid nanoparticles after intravenous administration. *Arch Pharm Res* [Internet]. 6 de febrero de 2011 [citado 21 de septiembre de 2024];34(2):331-7. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12272-011-0220-2>
643. Mohammadi P, Mahjub R, Mohammadi M, Derakhshandeh K, Ghaleiha A, Mahboobian MM. Pharmacokinetics and brain distribution studies of perphenazine-loaded solid lipid nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm*. 2021;47(1):146-52.
644. Di J, Du Z, Wu K, Jin S, Wang X, Li T, et al. Biodistribution and Non-linear Gene Expression of mRNA LNPs Affected by Delivery Route and Particle Size. *Pharm Res* [Internet]. 1 de enero de 2022 [citado 21 de septiembre de 2024];39(1):105-14. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-022-03166-5>
645. Chen S, Tam YYC, Lin PJC, Sung MMH, Tam YK, Cullis PR. Influence of particle size on the in vivo potency of lipid nanoparticle formulations of siRNA. *Journal of Controlled Release*. 10 de agosto de 2016;235:236-44.
646. Niu DK, Chen JK. Evolutionary Advantages of Cell Specialization: Save and Protect DNA. *J Theor Biol*. 7 de julio de 1997;187(1):39-43.

647. Gould SB. Membranes and evolution. *Current Biology* [Internet]. 23 de abril de 2018 [citado 22 de septiembre de 2024];28(8):R381-5. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S0960982218301520/fulltext>
648. Weiss MC, Preiner M, Xavier JC, Zimorski V, Martin WF. The last universal common ancestor between ancient Earth chemistry and the onset of genetics. *PLoS Genet* [Internet]. 1 de agosto de 2018 [citado 22 de septiembre de 2024];14(8):e1007518. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1007518>
649. Casares D, Escribá P V., Rosselló CA. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol 20, Page 2167 [Internet]. 1 de mayo de 2019 [citado 22 de septiembre de 2024];20(9):2167. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2167/htm>
650. Shan W, Wang C, Chen H, Ren L. Rational Design of Virus-like Particles for Nanomedicine. *Acc Mater Res* [Internet]. 27 de octubre de 2023 [citado 22 de septiembre de 2024];4(10):814-26. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/accountsmr.3c00050>
651. Sinervo B, Svensson E. Mechanistic and Selective Causes of Life History Trade-Offs and Plasticity. *Oikos*. diciembre de 1998;83(3):432.
652. Garland T, Downs CJ, Ives AR. Trade-offs (And constraints) in organismal biology. *Physiological and Biochemical Zoology* [Internet]. 1 de enero de 2022 [citado 23 de septiembre de 2024];95(1):82-112. Disponible en: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/717897>
653. Shoal O, Sheftel H, Shinar G, Hart Y, Ramote O, Mayo A, et al. Evolutionary trade-offs, pareto optimality, and the geometry of phenotype space. *Science* (1979) [Internet]. 1 de junio de 2012 [citado 23 de septiembre de 2024];336(6085):1157-60. Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1217405>
654. Prabhakar A, Choi J, Wang J, Petrov A, Puglisi JD. Dynamic basis of fidelity and speed in translation: Coordinated multistep mechanisms of elongation and termination. *Protein Science* [Internet]. 1 de julio de 2017 [citado 23 de septiembre de 2024];26(7):1352-62. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.3190>
655. Weiße AY, Oyarzún DA, Danos V, Swain PS. Mechanistic links between cellular trade-offs, gene expression, and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 3 de marzo de 2015 [citado 23 de septiembre de 2024];112(9):E1038-47. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1416533112>
656. Dal Magro R, Ornaghi F, Cambianica I, Beretta S, Re F, Musicanti C, et al. ApoE-modified solid lipid nanoparticles: A feasible strategy to cross the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release* [Internet]. 10 de marzo de

2017 [citado 12 de enero de 2021];249:103-10. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.039>

657. Dal Magro R, Albertini B, Beretta S, Rigolio R, Donzelli E, Chiorazzi A, et al. Artificial apolipoprotein corona enables nanoparticle brain targeting. *Nanomedicine*. 1 de febrero de 2018;14(2):429-38.
658. Zhao C, Zhang J, Hu H, Qiao M, Chen D, Zhao X, et al. Design of lactoferrin modified lipid nano-carriers for efficient brain-targeted delivery of nimodipine. *Materials Science and Engineering C*. 1 de noviembre de 2018;92:1031-40.
659. Wu Y, Song X, Kebebe D, Li X, Xue Z, Li J, et al. Brain targeting of Baicalin and Salvianolic acid B combination by OX26 functionalized nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm*. 25 de noviembre de 2019;571.
660. Sela M, Poley M, Mora-Raimundo P, Kagan S, Avital A, Kaduri M, et al. Brain-Targeted Liposomes Loaded with Monoclonal Antibodies Reduce Alpha-Synuclein Aggregation and Improve Behavioral Symptoms in Parkinson's Disease. *Advanced Materials*. 2023;
661. Gandomi N, Varshochian R, Atyabi F, Ghahremani MH, Sharifzadeh M, Amini M, et al. Solid lipid nanoparticles surface modified with anti-Contactin-2 or anti-Neurofascin for brain-targeted delivery of medicines. *Pharm Dev Technol*. 3 de abril de 2017;22(3):426-35.
662. Pashirova TN, Zueva I V., Petrov KA, Babaev VM, Lukashenko SS, Rizvanov IK, et al. Nanoparticle-Delivered 2-PAM for Rat Brain Protection against Paraoxon Central Toxicity. *ACS Appl Mater Interfaces*. 24 de mayo de 2017;9(20):16922-32.
663. Esposito E, Cortesi R, Drechsler M, Fan J, Fu BM, Calderan L, et al. Nanoformulations for dimethyl fumarate: Physicochemical characterization and in vitro/in vivo behavior. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1 de junio de 2017;115:285-96.
664. Marinelli L, Dimmito MP, Cacciatore I, Toto EC, Di Rienzo A, Palmerio F, et al. Exploring the application of Solid Lipid Nanoparticles loaded with Capsaicin rich extract in Parkinson's disease. *J Drug Deliv Sci Technol*. octubre de 2023;105097.
665. Yokel RA. Nanoparticle brain delivery: A guide to verification methods. *Nanomedicine*. 2020;15(4):409-32.

8 Anexos

Anexo 1: Información Suplementaria

Tabla A 1: Información fisicoquímica de los materiales a utilizar para las pruebas de formulación y la fabricación de nanopartículas lipídicas.

Material	CAS	Peso Molecular	Higroscopicidad	Sensibilidad Luz	Fórmula	Apariencia	Pureza	Solubilidad etanol
DOTAP	132172-61-3	698,54	Si	Si	C42H80ClNO4	Polvo	98	Más de 10 mg/mL
DLin-MC3-DMA	1224606-06-7	642,11	Si	si	C43H79NO2	Líquido	95	más de 60 mg/mL
DOTMA	104872-42-6	642,575	No	Si	C42H84ClNO2	Polvo	95	Soluble
DSPE-Maleimida	No encontrado	897,600		si	C48H86N2O11P		95	Soluble
DSPC	816-94-4	790,15	Si	Si	C44H88NO8P	Polvo	99	25 mg/mL
DOPE	4004-05-1	744,03	Si	Si	C41H78NO8P	Polvo	99	Soluble
Colesterol	57-88-5	386,65	No	No	C27H46O	Polvo	99	10 mg/mL
RVG	No encontrado	3266,7	Si	si	C141H217N43O43S2	Polvo	95	Soluble
Trasnerrina	No encontrado	1490,8	Si	si	-	Polvo		Soluble
DSPEm-PEG2000	147867-65-0	2790		si	-	Polvo	95	Soluble
Col-mPEG-MAL	25322-68-3	2593	si	si	C48H77N3O10	Polvo	95	Soluble
DSPE-mPEG-MAL	474922-22-0	3130	Si	si	C139H271N4O57P	Polvo	95	Soluble

Tabla A 2: Nombre IUPAC de los excipientes utilizados en la formulación de las nanopartículas lipídicas.

Material	CAS
DOTAP	1,2-di-(9Z-octadecenyl)-3-trimethylammonium-propane
DLin-MC3-DMA	Butanoic acid, 4-(dimethylamino)-, (10Z,13Z)-1-(9Z,12Z)-9,12-octadecadien-1-yl-10,13-nonadecadien-1-yl ester
DOTMA	1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane
DSPE-Maleimida	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine – pirrol-2,5-diona
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
Colesterol	3beta.Hydroxyl-5-cholestene,5-Cholesten-3beta-ol
DSPEm-PEG2000	1,2-distearoyl-sn-glycero-3phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]
DSPE-mPEG-MAL	1,2-distearoyl-sn-glycero-3phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] - pirrol-2,5-diona
Colesterol-mPEG-MAL	3beta.Hydroxyl-5-cholestene,5-Cholesten-3beta-ol -N-[amino(polyethylene glycol)-2000] - mamleimida

Tabla A 3: Composición de la fase lipídica y valores de atributos para el DoE de mezcla de vértices externos, grado 1 y 17 puntos de diseño

Orden Corrida	Composición lipídica (%)				Valores de Atributos			
	PEGlipid	DSPC	DOTAP	Colesterol	PSD	PDI	Pot Zeta	EE
1	0,05	0,2	0,2	0,55	101	0,251	36,0	96,84
2	0,01	0,05	0,2	0,74	104	0,208	35,7	98,76
3	0,02	0,1625	0,425	0,3925	88	0,183	50,9	99,99
4	0,01	0,2	0,2	0,59	107	0,201	39,7	99,49
5	0,05	0,05	0,2	0,7	78	0,161	29,9	96,82
6	0,02	0,0875	0,275	0,6175	85	0,213	53,2	98,20
7	0,04	0,1625	0,425	0,3725	100	0,220	44,2	100,18
8	0,01	0,2	0,5	0,29	102	0,235	51,8	100,58
9	0,03	0,125	0,35	0,495	81	0,170	37,5	98,88
10	0,05	0,05	0,5	0,4	84	0,229	38,2	100,34
11	0,05	0,2	0,5	0,25	101	0,254	53,3	100,45
12	0,02	0,0875	0,425	0,4675	81	0,206	53,3	100,30
13	0,04	0,1625	0,275	0,5225	93	0,264	41,3	99,42
14	0,04	0,0875	0,275	0,5975	79	0,201	39,4	100,07
15	0,04	0,0875	0,425	0,4475	116	0,315	40,3	100,41
16	0,01	0,05	0,5	0,44	83	0,268	50,0	100,67
17	0,02	0,1625	0,275	0,5425	85	0,227	23,7	100,09

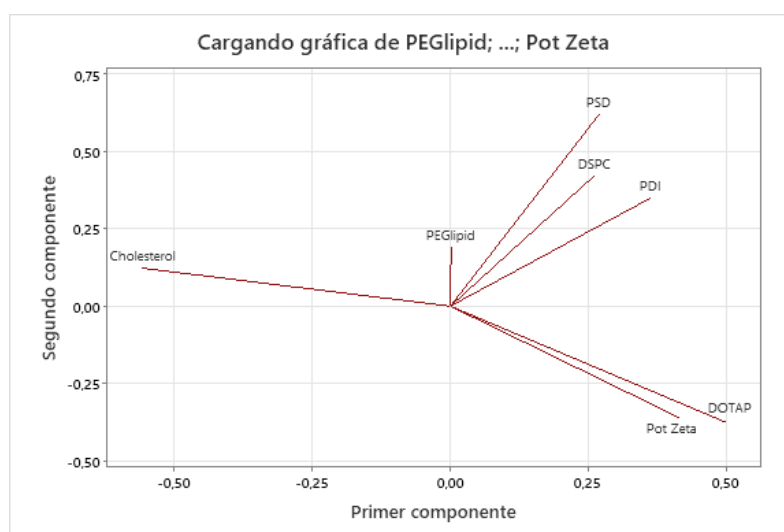


Figura A 1: Gráfica de influencias del análisis de componentes principales para evaluar la influencia de la mezcla de componentes lipídicos en el tamaño de partícula, polidispersidad y potencial zeta de las nanopartículas.

Análisis de los dos primeros componentes principales derivados del análisis estadístico aplicado a los datos del DoE de la sección 4.1.2.1. Los vectores correspondientes al tamaño de partícula (PSD) y el PDI muestran una alineación cerca al vector del DSPC, lo que sugiere una correlación positiva significativa con el contenido porcentual de DSPC en la formulación, respaldando lo indicado por el análisis de regresión presentado en la sección de resultados. Por otra parte, los vectores asociados al DOTAP y el Cholesterol, exhiben poca correlación con los valores de tamaño y polidispersidad, reflejado en su orientación casi perpendicular respecto a estos atributos. Por otra parte, el DOTAP se encuentra alineado con el valor del potencial zeta, lo cual es consistente con las naturaleza catiónica de este excipiente.

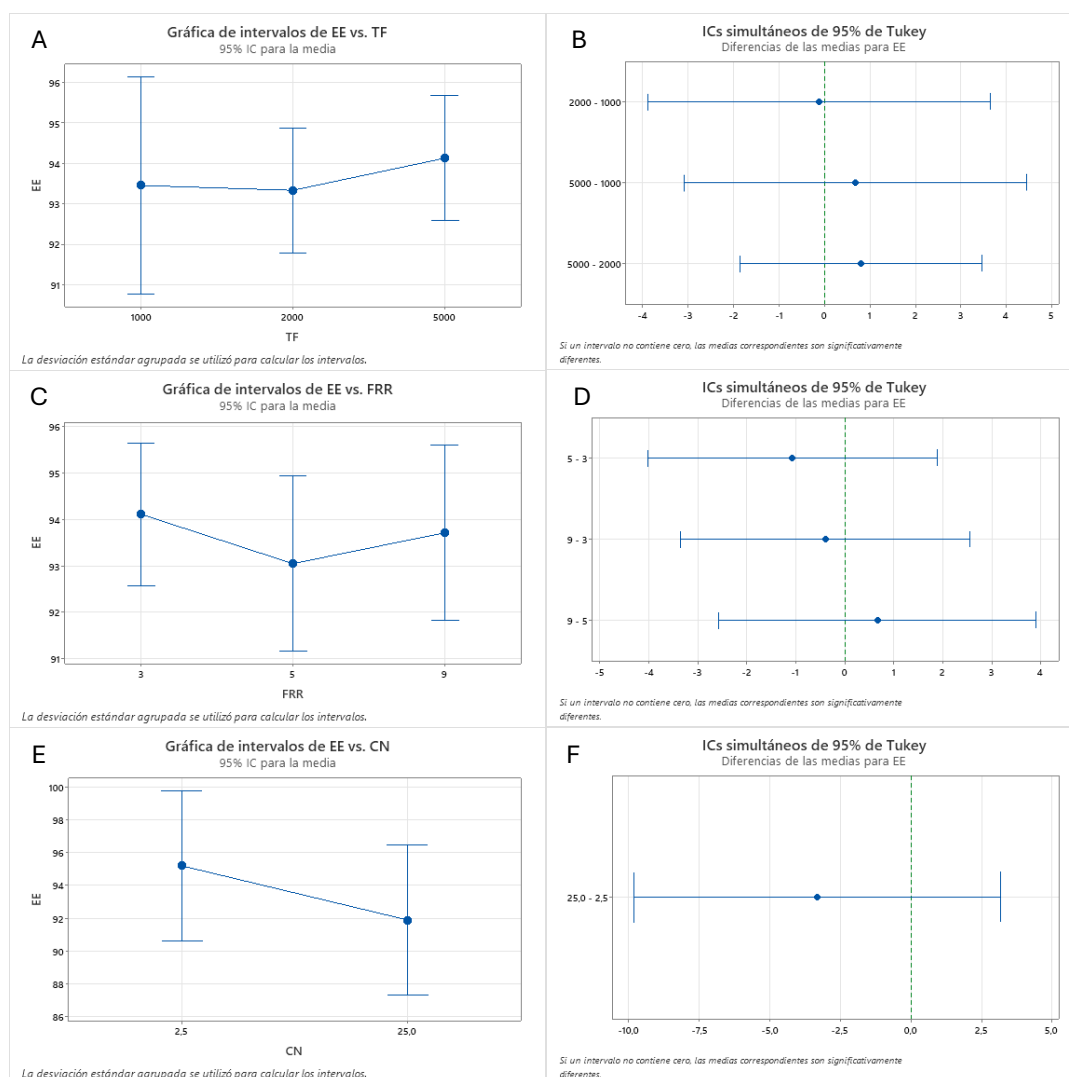


Figura A 2: Influencia del flujo total, la proporción de flujo tipo y la concentración total de lípidos en la eficiencia de encapsulación de RNA. Se muestran los efectos principales en la eficiencia de encapsulación del flujo total (A), la proporción de flujo (C) y la concentración total de lípidos (E). En todos los casos, la cantidad de RNA agregada se calcula según los cambios en la cantidad de lípido catiónico/ionizable para mantener una proporción de nitrógeno/fosfato de 3. Se observa cómo las medias de cada factor se encuentran comprendidas dentro del rango de intervalos de confianza de los otros factores evaluados. Adicionalmente, las gráficas de intervalos de confianza de Tukey (B, D y F) detallan las comparaciones pareadas entre los distintos valores de flujo total, proporción de flujo y concentración de lípidos totales, y se muestra como todas las diferencias de medias incluyen algún punto que cruza el cero (línea verde horizontal). Esto significa que no existen diferencias estadísticamente significativas en el potencial zeta debido a estos factores evaluados según lo descrito en la sección 4.1.4. TF = flujo total; FRR = proporción de flujo; IC = intervalo de confianza.

Tabla A 4: Resultados de contenido de maleimida por lote de nanopartículas obtenidos a mediante espectrofotometría ultravioleta-visible empleando el reactivo de Ellman

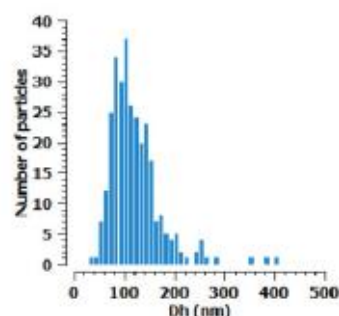
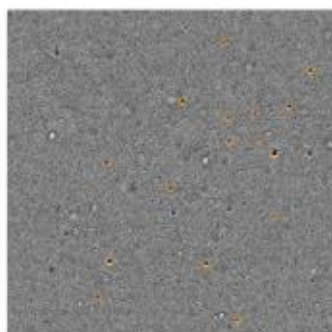
Lípido empleado en la fabricación	Contenido de maleimida en el lote de nanopartículas (µM)					
	R1	R2	R3	R4	R5	DSR
LNP-Chol-mPEG-MAL	73,20	7,39	89,67	26,02	41	71,08
LNP-DSPE-mPEG-MAL	165,79	13,77	120,47	21,02	11	108,32
LNP-DSPE-MAL	98,93	26,60	143,66	24,72	39	79,11

Ronny-LNP-sin-dialisis-D100R1

Concentration	Median diameter	Mean diameter 122 nm
3.99e+9	112	Modal diameter 105 nm
part/mL	nm	D90 178 nm
		D50 112 nm
		D10 73 nm
		Standard deviation 50 nm

Number of videos: 3
Saturation: 93%

Average tracked particles: 25 /frame
Total tracked particles: 300



Comments:

Settings:

ACQUISITION
Particles to track (minimum): 300
Max number of videos: 20
Number of frames: 100
Averaging frames: 100
Exposure time (ms): 0.73

LED SETTINGS
Intensity (%): 86

PHYSICAL CONSTANTS
Temperature (°C): 22.4
Use water viscosity: yes
Viscosity (mPa.s): 0.945

Institution: Myriade
Serial number: VD1-1911-0005
Camera type: Type 3
Software version: qvir: 2.7.2.8018
Operator: MYRIADE
Begin date: 21.03.2024 - 17:07:29 - UTC+1
End date: 21.03.2024 - 17:08:08

myriade

Figura A 3: Reporte de análisis de microscopia de luz interferométrica de una dilución 1:100 del prototipo de nanopartículas lipídicas desarrollada. El resultado obtenido tanto en tamaño como en visualización es coincidente con las observaciones previas de determinaciones de tamaño de partículas por DLS y observación de las nanopartículas por microscopía electrónica y microscopía de fuerza atómica. El valor de cantidad de nanopartículas es un parámetro poco explorado en la abundante bibliografía disponible. El valor reportado para el prototipo en la Tabla 37, sección 4.1.5 corresponde a un promedio calculado a partir de 17 mediciones distintas.

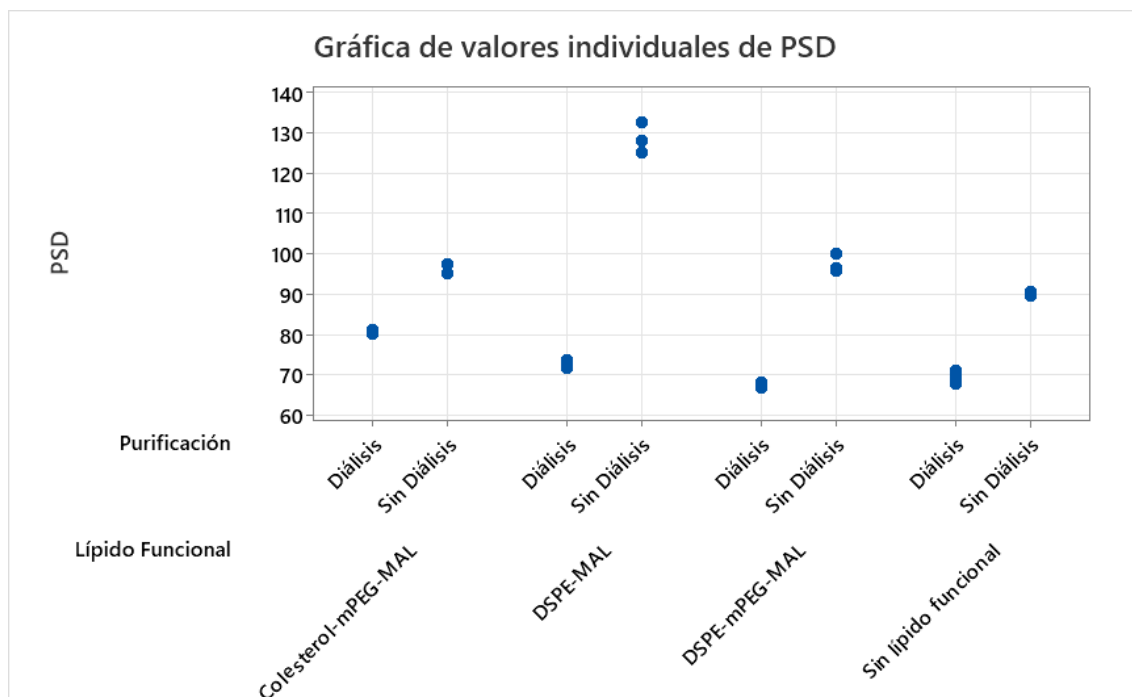


Figura A 4: Influencia de la diálisis y el tipo de lípido funcional en el tamaño de partícula (PSD). Esta gráfica corresponde a un complemento de la información presentada en la sección 4.2.1.1. Notablemente, el lípido DSPE-MAL implica diferencias más marcadas entre el tamaño de partícula con y sin diálisis.

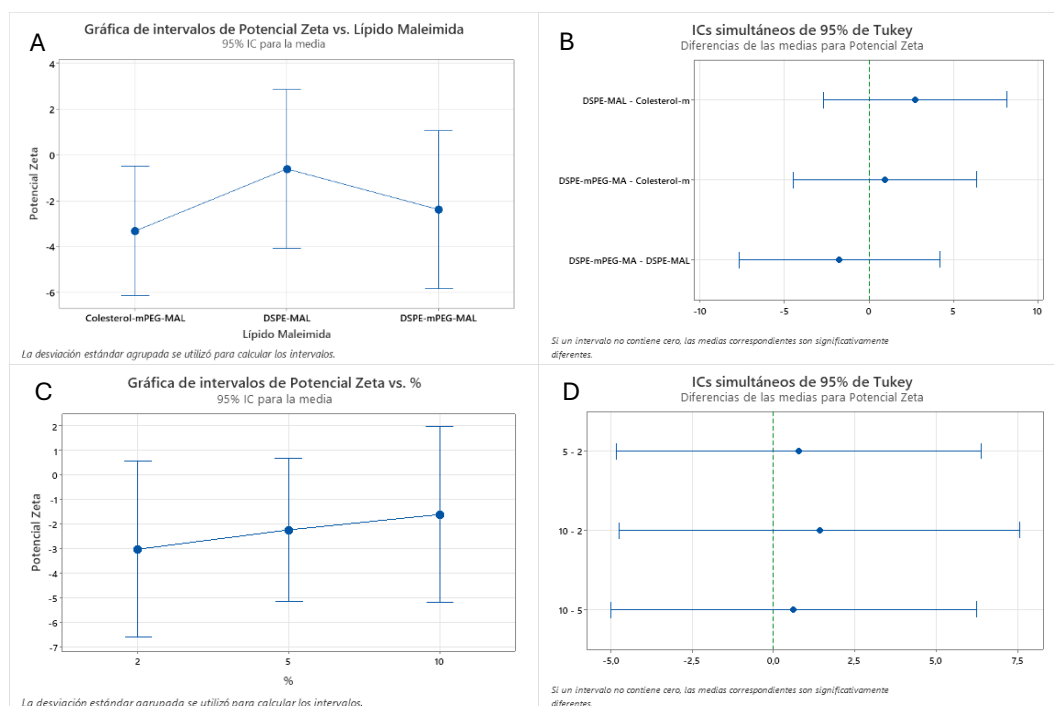


Figura A 5: Influencia del tipo de lípido y porcentaje del lípido funcional en el potencial zeta de las nanopartículas.

Se muestran los efectos principales en el potencial zeta del tipo (A) y del porcentaje (C) del lípido maleimida. Se observa cómo las medias de cada factor se encuentran comprendidas dentro del rango de intervalos de confianza de los otros factores. Adicionalmente, las gráficas de intervalos de confianza de Tukey (B y D) detallan las comparaciones pareadas entre los distintos tipos de lípido y porcentajes de utilización, y se muestra como todas las diferencias de medias incluyen algún punto que cruza el cero (línea verde horizontal), lo que significa que no existen diferencias estadísticamente significativas en la medida del potencial zeta a causa de estos factores asociados al lípido funcional, basado en los datos generados en la sección 4.2.1.1. IC = intervalo de confianza.

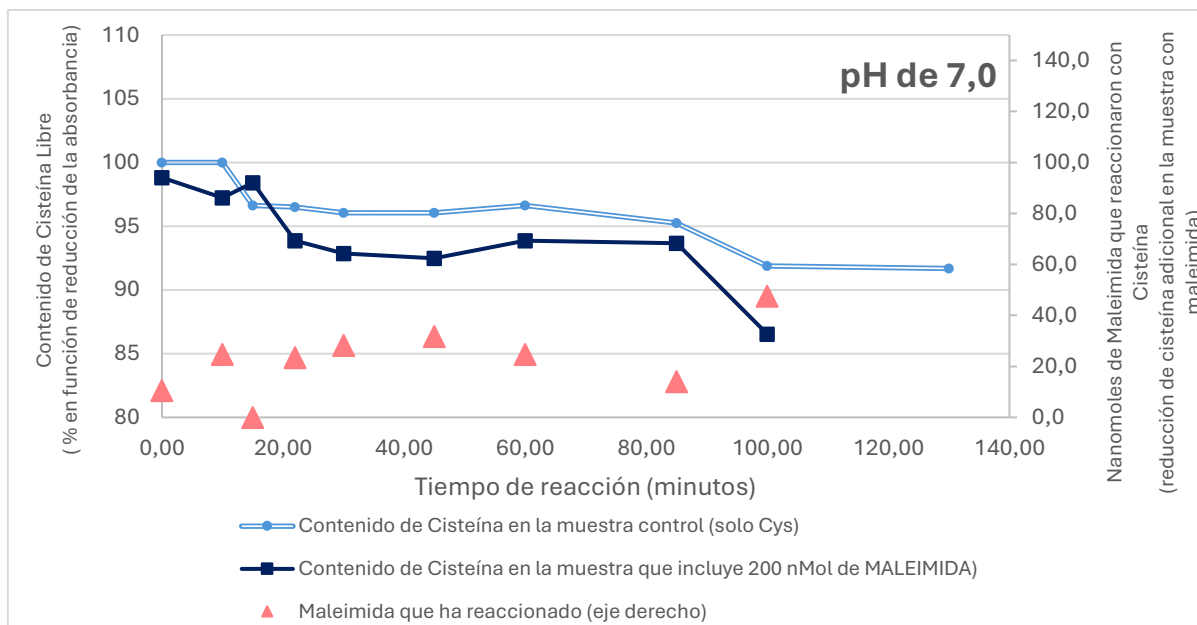


Figura A 6: Análisis de la cinética de reacción entre cisteína y lipido maleimida (DSPE-mPEG-MAL) a pH 7,0 aplicando el reactivo de Ellman. La línea azul oscuro muestra la cantidad residual de cisteína en una muestra incubada con maleimida. La muestra contiene alrededor de 891 nanomoles de cisteína y 200 nanomoles de maleimida (exactamente agregados). Un valor de cisteína residual de 77% correspondería a una reacción eficiente entre la cisteína y la maleimida. En vista de que el valor más bajo de cisteína residual corresponde a un 86%. Esto sugiere una baja eficiencia de reacción. Adicionalmente, las reducciones en la línea celeste (que contiene únicamente cisteína) indican que la cisteína por sí misma tiende a reducir su concentración hasta aproximadamente 92%, posiblemente por la creación de puentes disulfuro. Eso sugiere inespecificidad. Los triángulos rojos representan la diferencia entre la concentración de cisteína de ambas muestras, estimando la cisteína que podría haber reaccionado propiamente con la maleimida. De un máximo de 200 nanomoles de maleimida agregados, únicamente se está pudiendo cuantificar una reacción equivalente a 47,6 nanomoles, lo que evidencia también la baja eficiencia de reacción observada.

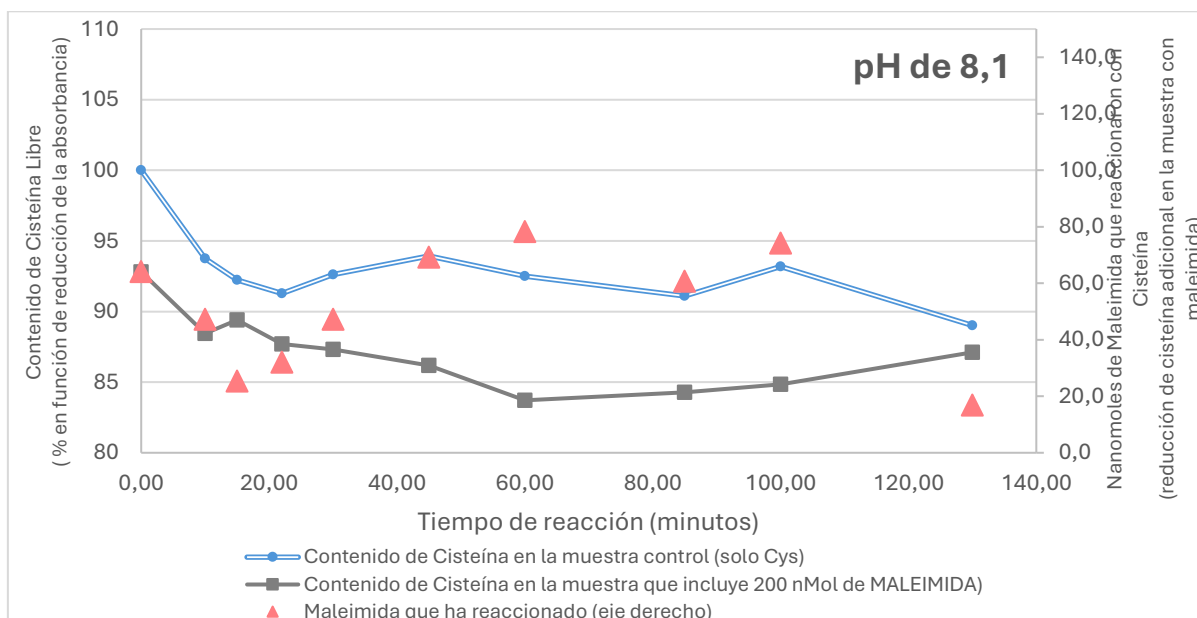


Figura A 7: Análisis de la cinética de reacción entre cisteína y lipido maleimida (DSPE-mPEG-MAL) a pH 8,1 aplicando el reactivo de Ellman. Si bien es cierto en algún punto se llega a obtener valores de cuantificación de maleimida superiores (hasta 78 nanomoles) este valor no es estable y además se observa una reducción de la cisteína sola (línea celeste) de mayor magnitud de la diferencia observada a pH de 7,0 (valor mínimo de 89%). Esto arroja datos adicionales sobre la inestabilidad de las reacciones involucradas en esta prueba.

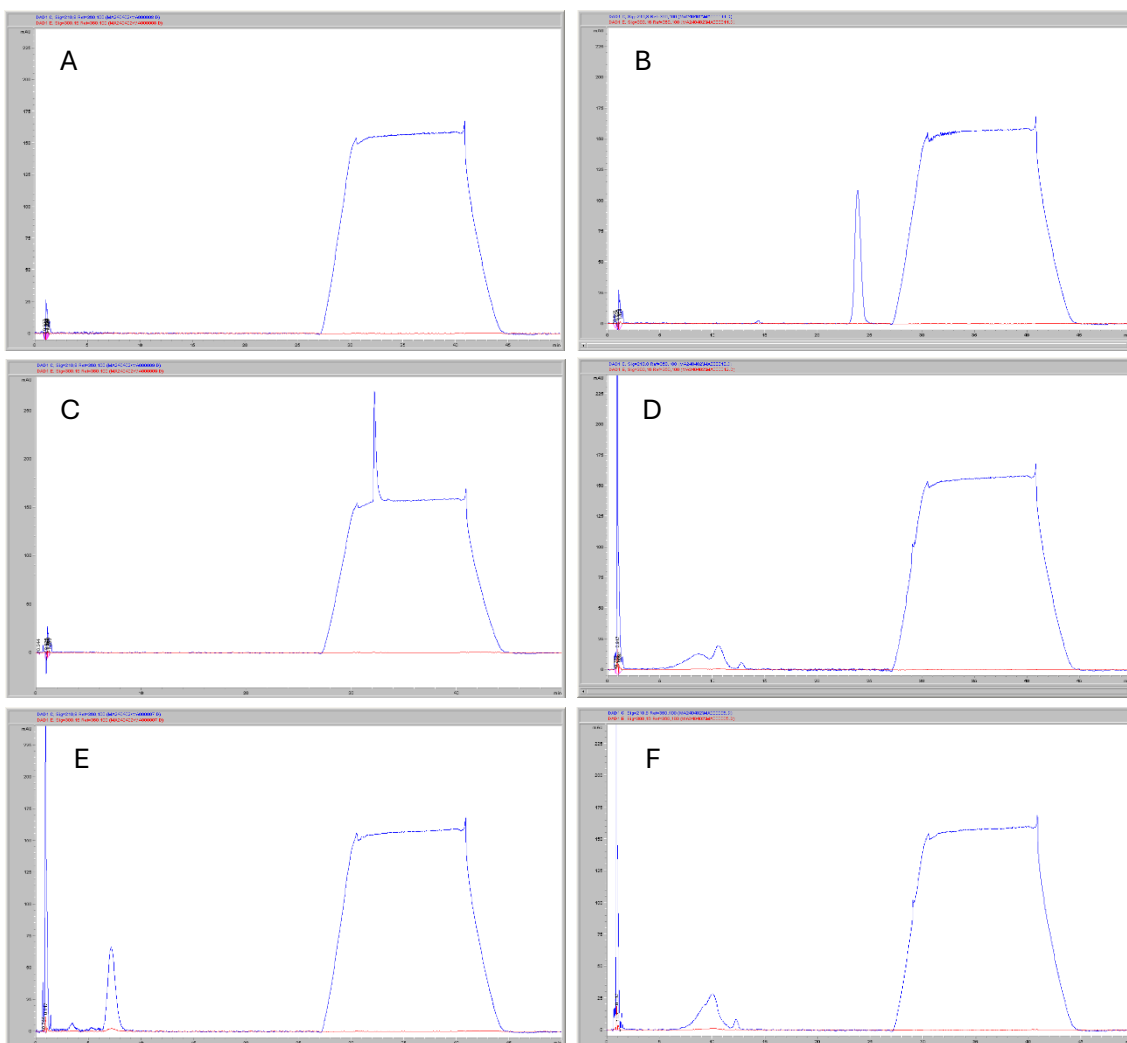


Figura A 8: Cromatogramas de los materiales empleados para la fabricación de nanopartículas lipídicas. Obtenidos con el método 22 indicado en la Tabla 38, sección 4.2.1.2. A: Blanco; B: Colesterol; C: DLin-MC3-DMA; D: DSPE-MAL; E: Colesterol-MAL; F: DSPE-mPEG-MAL. Aunque los picos de D, E y F poseen tiempos de retención similares, estos no se colocan juntos en la formulación en ningún momento. Por lo tanto, con los que sí se formulan juntos, los materiales presentan una apropiada resolución de picos que permite la identificación y cuantificación de materiales dentro del rango de concentraciones observadas (1 mM).

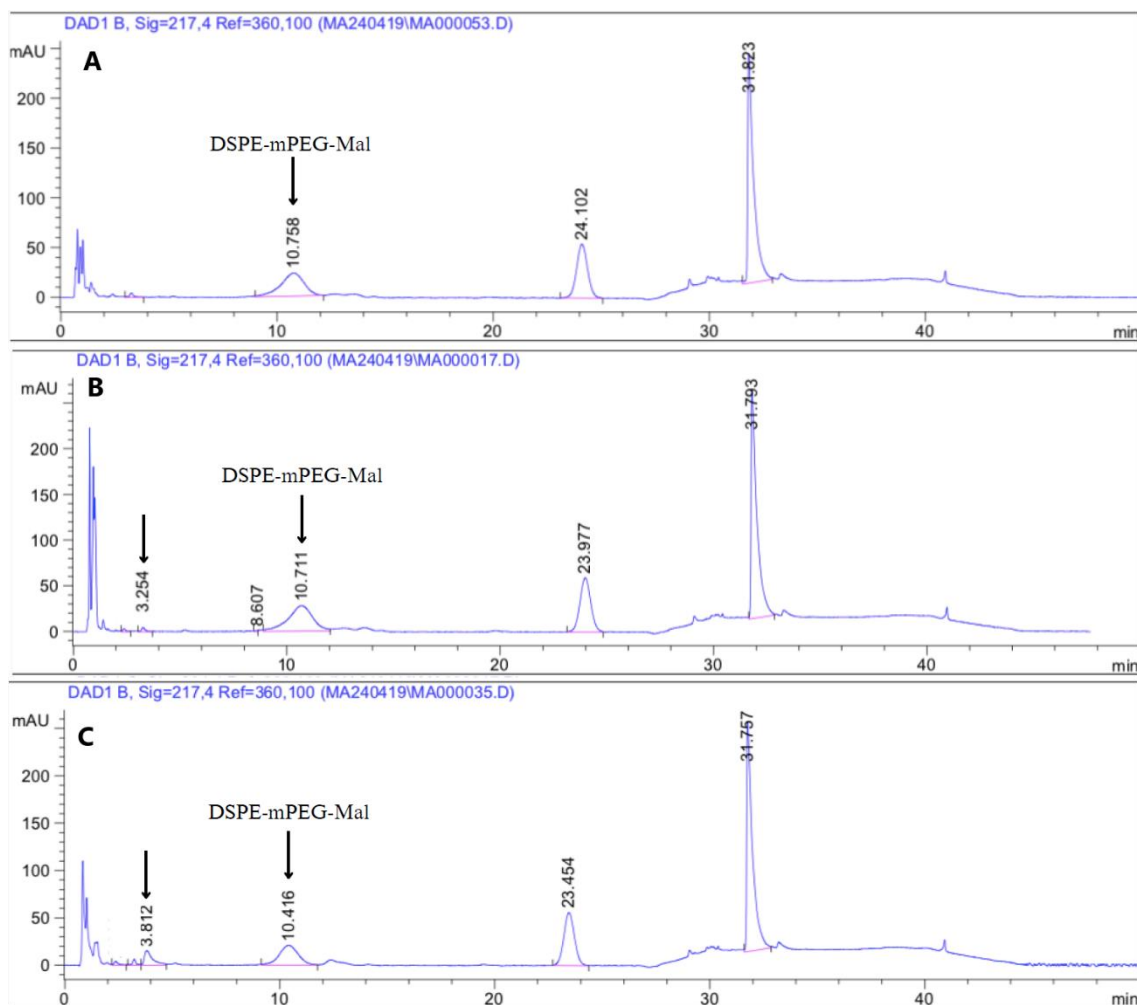


Figura A 9: Cromatogramas de la suspensión de nanopartículas lipídicas sin purificar y purificadas con tampón de citratos y con PBS 1X. A: muestra sin diálisis, B: muestra dializada con tampón de citratos C: muestra dializada con PBS 1X. En ambos casos en que se aplica diálisis, se observa una reducción del pico principal del excipiente maleimida. En el caso de la muestra dializada con PBS 1X, esta reducción es más pronunciada y, además, se observa el aumento de un pico inespecífico alrededor de los 3,8 minutos, el cual podría corresponder a una impureza. Como esta impureza no se observa en la muestra dializada con citratos, y dado que la muestra dializada con PBS 1X el crecimiento de este pico viene acompañado con una mayor reducción del pico principal, es posible que esta reducción adicional sea el resultado de dos procesos: la eliminación del excipiente en el sobrenadante (la cuál debería ser comparable para ambas muestras) y una posible hidrólisis parcial del excipiente en las condiciones del PBS 1X, cuyo producto se detecta a los 3,8 minutos. Esto sugiere que, bajo estas condiciones, el excipiente maleimida es susceptible a sufrir una hidrólisis parcial, lo que afecta su disponibilidad total.

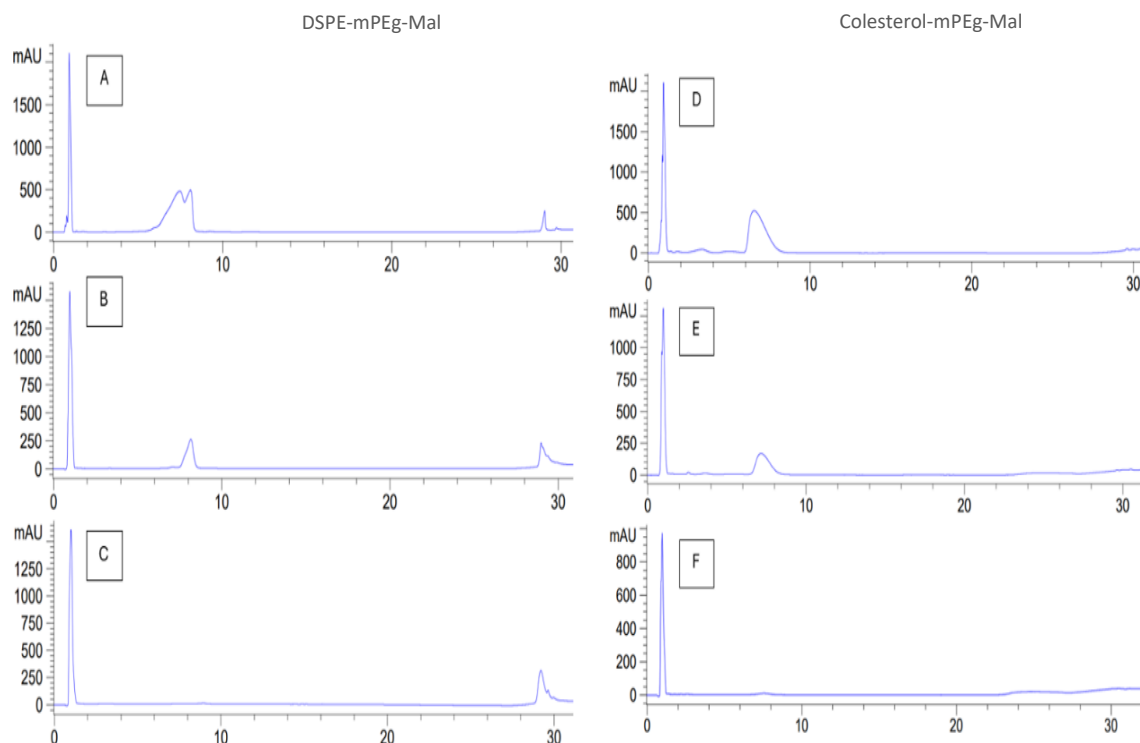


Figura A 10: Seguimiento de la reacción péptido-maleimida mediante HPLC. De arriba hacia abajo se muestra la progresión de muestras en que consistió esta prueba de seguimiento. Primero se muestran cromatogramas de muestras conteniendo únicamente el lípido maleimida (A y D). En el medio los cromatogramas de muestras con una proporción 0,5:1 de péptido maleimida en el que debería haber presencia tanto de lípido maleimida residual, como del complejo de reacción maleimida-péptido (B y E). Finalmente, en la parte inferior se incluyen cromatogramas con un exceso de péptido respecto a la maleimida (2:1) en el que debería encontrarse el complejo, péptido libre y ninguna maleimida residual (si la reacción es completa). Los paneles A, B y C muestran a la izquierda el seguimiento empleando DSPE-mPEG-Maleimida, mientras que los paneles E, D y F el seguimiento con Colesterol-mPEG-Maleimida a la derecha. Los paneles B y E muestran una reducción del pico de maleimida demostrando que la cuantificación depende de la maleimida libre, y que esta reducción se puede utilizar como medida de la disponibilidad de la maleimida. Adicionalmente, en el cromatograma de B se observa un crecimiento considerable de un pico ubicado a los 30 minutos de corrida. La diferencia de ese pico con la línea base del cromatograma A. En el caso del colesterol también se observan cambios a los 30 minutos, pero con poca definición y no permitirían una adecuada integración de la señal analítica. Finalmente, los cromatogramas C y F muestran una desaparición de los picos originales del excipiente maleimida, confirmando que este método puede utilizarse como una medida de la disponibilidad de este. El cromatograma correspondiente al DSPE-mPEG-MAL muestra un aumento aún más pronunciado del pico observado a 30 minutos mientras que el cromatograma F muestra un panorama más difícil de emplear para el seguimiento de la reacción. Si bien es cierto no brinda información sobre si la reacción con un lípido es más eficiente que con el otro, sí brinda información sobre la aptitud de utilizar el método HPLC-UV para cuantificación de componentes para dar seguimiento a dicha reacción cuando se emplea uno u otro lípido funcional.

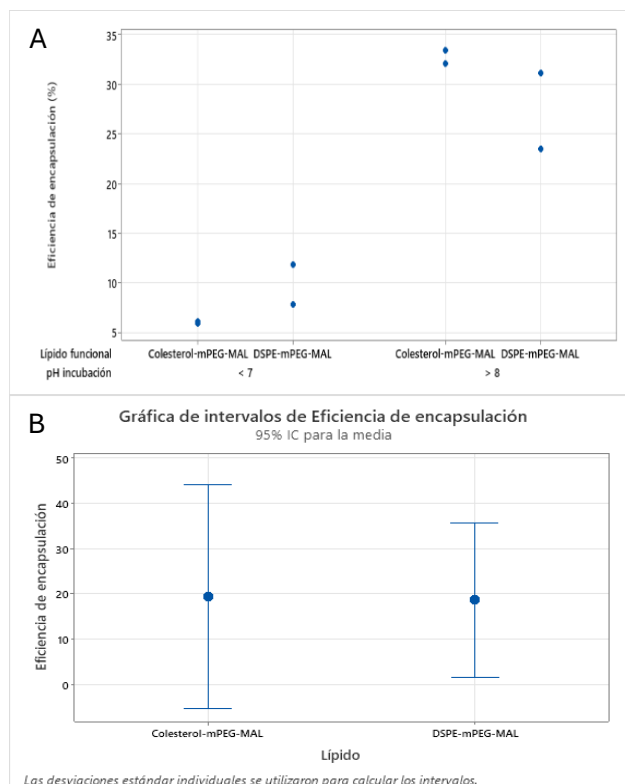


Figura A 11: Eficiencia de funcionalización de nanopartículas preparadas con Colesterol-mPEG-MAL y DSPE-mPEG-MAL en dos condiciones funcionalización. Los hallazgos hasta la sección 4.2.1 sugieren que el DSPE-mPEG-MAL y el Colesterol-mPEG-MAL son comparables en la expresión superficial de maleimida, necesarias para la incorporación de péptidos a las nanopartículas. Para comprobar de forma preliminar el comportamiento de ambos lípidos en condiciones de funcionalización, se realizó un experimento empleando el péptido derivado de la glicoproteína del virus de la rabia (RVG). Se utilizó para funcionalizar nanopartículas fabricadas con 5% de DSPE-mPEG-Mal o 5% de Colesterol-mPEG-MAL, y que fueron dializadas en PBS 1X antes de la incubación con un exceso de péptido 2:1 durante una hora a dos valores distintos de pH. Posteriormente las muestras fueron purificadas con PBS 1X para eliminar el exceso de péptido. La eficiencia de funcionalización se determinó mediante cuantificación del péptido incorporado, empleando análisis de aminoácidos tras hidrólisis y derivatización. El análisis de varianza demostró que no existen diferencias significativas entre la eficiencia de funcionalización obtenida con estos dos excipientes entre sí, pero si diferencias debidas al valor de pH empleado para la incubación (valor $p > 0,05$, $N = 8$). Debido a esto se procedió con los experimentos para optimizar la funcionalización únicamente con uno de los dos excipientes.

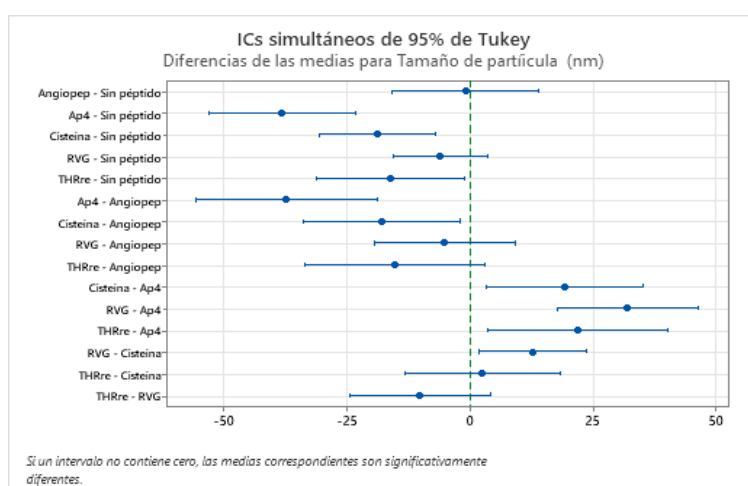


Figura A 12: Gráficas de intervalo de confianza simultáneos de Tukey para las comparaciones del impacto de diferentes péptidos en el tamaño de las nanopartículas lipídicas. Análisis complementario a la representación de la Figura 76, sección 4.2.4. Las comparaciones entre las diferentes medias, analizando una por una todas las combinaciones de dos medias muestran diferencias estadísticamente significativas cuando los intervalos de la diferencia entre sus medias no cruzan la línea del cero (línea verde horizontal).

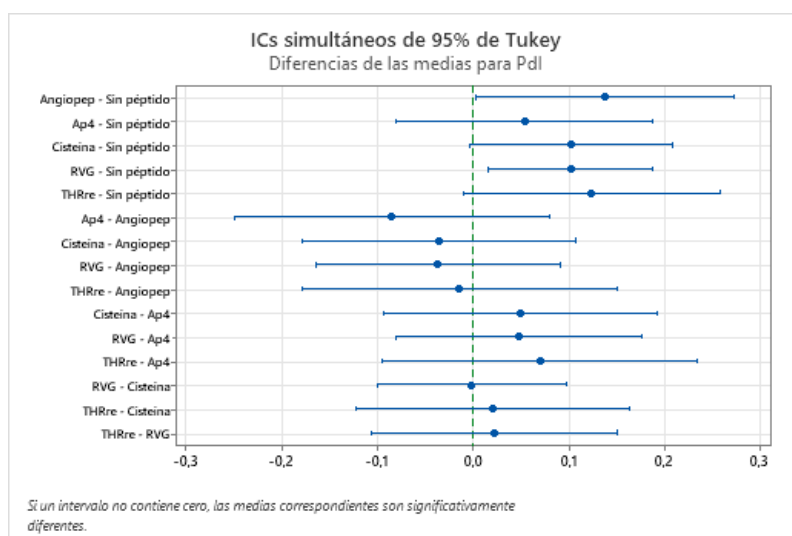


Figura A 13: Gráficas de intervalo de confianza simultáneos de Tukey para las comparaciones del impacto de diferentes péptidos en el PDI de las nanopartículas lipídicas. Análisis complementario a la representación de la Figura 78, sección 4.2.4. Las comparaciones entre las diferentes medias, analizando una por una todas las combinaciones de dos medias muestran diferencias estadísticamente significativas cuando los intervalos de la diferencia entre sus medias no cruzan la línea del cero (línea verde horizontal). De forma confirmatoria que las diferencias de medias que incluye comparación con la no funcionalización son las únicas que muestran diferencias significativas.

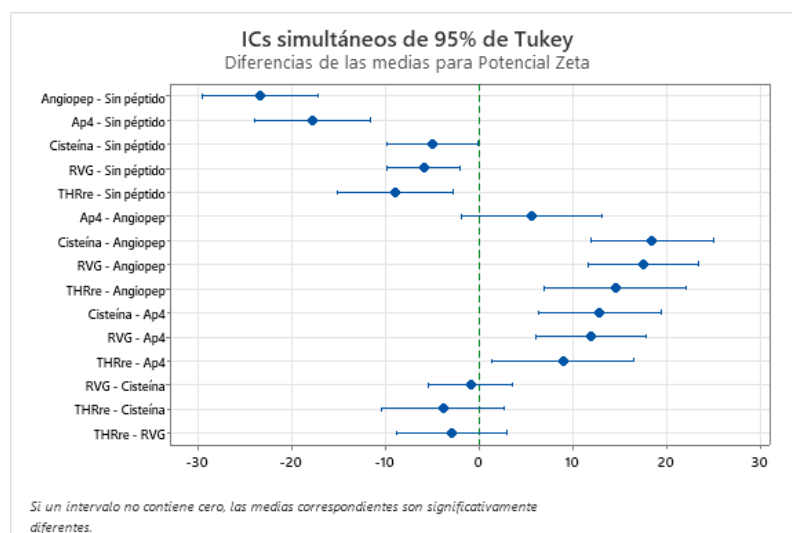


Figura A 14: Gráficas de intervalo de confianza simultáneos de Tukey para las comparaciones del impacto de diferentes péptidos en el potencial zeta de las nanopartículas lipídicas. Análisis complementario a la representación de la Figura 80, sección 4.2.4. Las comparaciones entre las diferentes medias, analizando una por una todas las combinaciones de dos medias muestran diferencias estadísticamente significativas cuando los intervalos de la diferencia entre sus medias no cruzan la línea del cero (línea verde horizontal).

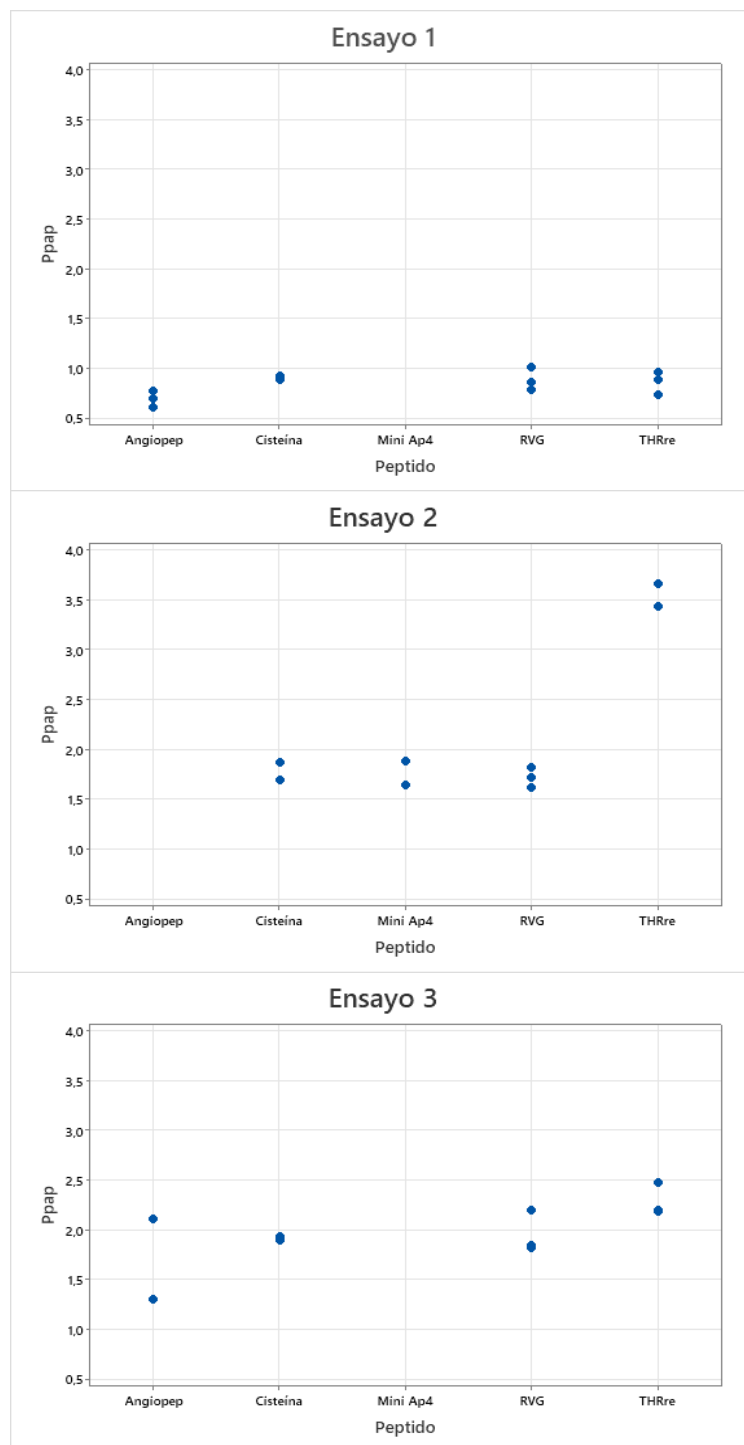


Figura A 15: Evaluación comparativa de la permeabilidad aparente a través del modelo *in vitro* de BHE de las nanopartículas funcionalizadas con diferentes péptidos. Las medias de las diferentes observaciones son diferentes para cada uno de los ensayos, particularmente comparando el primer ensayo, con el segundo y el tercero. La diferencia más marcada entre muestras se observa para el THRre, ensayo 2. Los resultados del ensayo 2 y el ensayo 3 deben interpretarse por cautela ya que los valores de permeabilidad aparente de *lucifer yellow* obtenidos fueron de 18,35 y 19,40 $\times 10^6$ cm/s, por encima de del estándar del método (15 $\times 10^6$ cm/s).

Tabla A 5: Revisión bibliográfica de detalles prácticos sobre la administración de nanopartículas en ensayos con ratones de laboratorio

Referencia	Tipo de vehículo	Ratón	Vía de Administración	Volumen administrado (μL)	Concentración o dosis aplicada
(654)	SLNs	Balb/c	Intraperitoneal, intravenosa (IV) e intratraqueal	50	10 mg de lípidos totales por mL
(655)	"otro"	Balb/c	IV	100	33 mg de lípidos totales por Kg de peso del animal
(656)	NLCs	Balb/c	IV	No indicado	0,5 mg de fluoróforo/mL (no se especifica proporción con lípidos en la formulación aplicada)
(657)	NLCs	Balb/c	IV	No indicado	2 mg de fluoróforo por Kg de peso del animal (no se especifica proporción con lípidos en la formulación aplicada)
(454)	SLNs	Balb/c	IV	No indicado	No indicado
(658)	Liposomas	C57BL	IV	350	Entre 5,8 y 8,5 X10 ¹² partículas por mL de suspensión
(449)	SLNs	C57BL	IV	No indicado	140 y 280 mg de lípidos totales por kg del peso del animal
(120)	Liposomas	C57BL	IV	No indicado	15,2 μmol de fosfolípidos por Kg de peso del animal
(659)	SLNs	C57BL	no indicado	no indicado	50 mg de coumarina por kg (no se especifica proporción con lípidos en la formulación aplicada)
(460)	SLNs recubiertos con macrófagos	C57BL	IV	No indicado	75 mg de lípidos totales por Kg de peso del animal

Nota: La tabla ilustra la heterogeneidad en la descripción de consideraciones prácticas para la administración de las nanopartículas a ratones, que en algunos casos implica incluso la dificultad para extrapolar esas condiciones de administración a una formulación específica.

Tabla A 6: Esquema de diluciones empleado para las pruebas de establecimiento de protocolo de administración.

Dilución	Concentración			Observaciones
	nanopartículas /mL	mM/L (lípidos totales)	mg/mL (lípidos totales)	
1 X	$(4,03 \pm 0,47) \times 10^{11}$	4	42,90	Riesgo bajo para la seguridad de los ratones (según datos de la tabla A3). Esta información justificó la realización de una primera prueba de tolerabilidad y detección con nanopartículas sin funcionalizar. Los resultados mostraron ausencia de toxicidad y una adecuada detección de intensidad de fluorescencia <i>in vivo</i> .
0,5 X	$(2,01 \pm 0,24) \times 10^{11}$	1	21,45	Al tratarse de una dilución de la concentración 1X, posee un menor riesgo de seguridad para el animal, pero un mayor riesgo respecto a la detectabilidad. Por ese motivo se incluyó en a primera prueba de tolerabilidad y detección, mostrando también una detectabilidad apropiada. Esta dilución se incluyó también en la segunda prueba, cuyos resultados se reportan en las figuras A15, A16 y A17.
0,25 X	$(1,01 \pm 0,12) \times 10^{11}$	0,5	10,72	Se ejecuta una segunda prueba para seguir evaluando detectabilidad. El objetivo consistió en encontrar una dosis relativamente baja para minimizar el riesgo de toxicidad crónica. En esta ocasión se volvió a incluir la dosis de 0,5X para proporcionar un punto de referencia con la primera prueba, además de las dos diluciones siguientes. Los resultados de esta evaluación se encuentran en las figuras A15, A16 y A17.
0,125X	$(5,04 \pm 0,59) \times 10^{10}$	0,25	5,36	

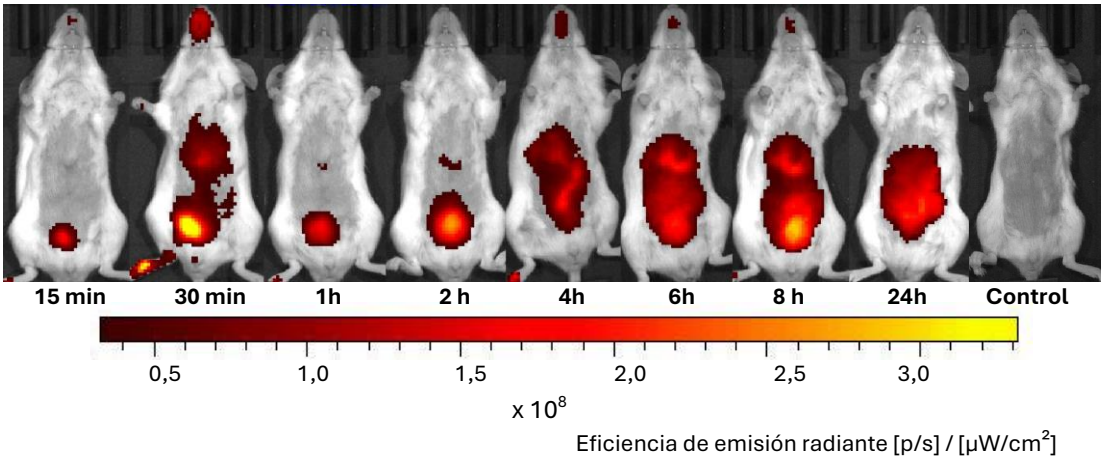


Figura A 16: Imágenes de fluorescencia *in vivo* captadas durante la prueba de ajuste de dosis para protocolo de administración de nanopartículas en ratones de experimentación. La segunda prueba de ajuste de dosis realizada con nanopartículas sin funcionalizar incluyó las dosis 1, 2 y 3 corresponden a 0,125X; 0,25X y 0,5X, respectivamente. Las imágenes de esta figura corresponden al ratón 9 (de un total de 12) al cuál se le administró la dosis de 0,5 X. Se puede ver una adecuada visualización de la fluorescencia con una acumulación inicial en la zona de le vejiga urinaria y una progresiva acumulación en la zona que posiblemente corresponde a hígado e intestinos.

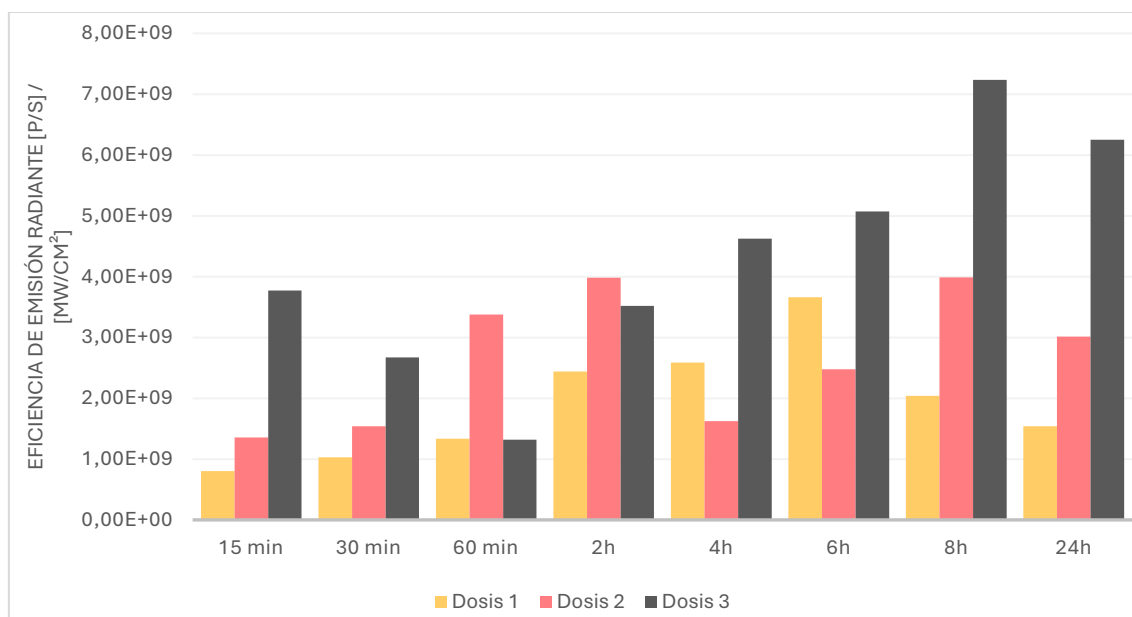


Figura A 17: Fluorescencia total captada durante la prueba de ajuste de dosis para protocolo de administración de nanopartículas en ratones de experimentación.

Los resultados presentados en esta imagen corresponden a la segunda prueba de ajuste de dosis realizada con nanopartículas sin funcionalizar, en un ensayo que incluyó 12 ratones. Las dosis 1, 2 y 3 corresponden a 0,125X; 0,25X y 0,5X, respectivamente. Se pudo observar una adecuada detectabilidad aún con la dosis más baja y en general se puede ver una fluorescencia cuya intensidad depende de la dosis administrada.

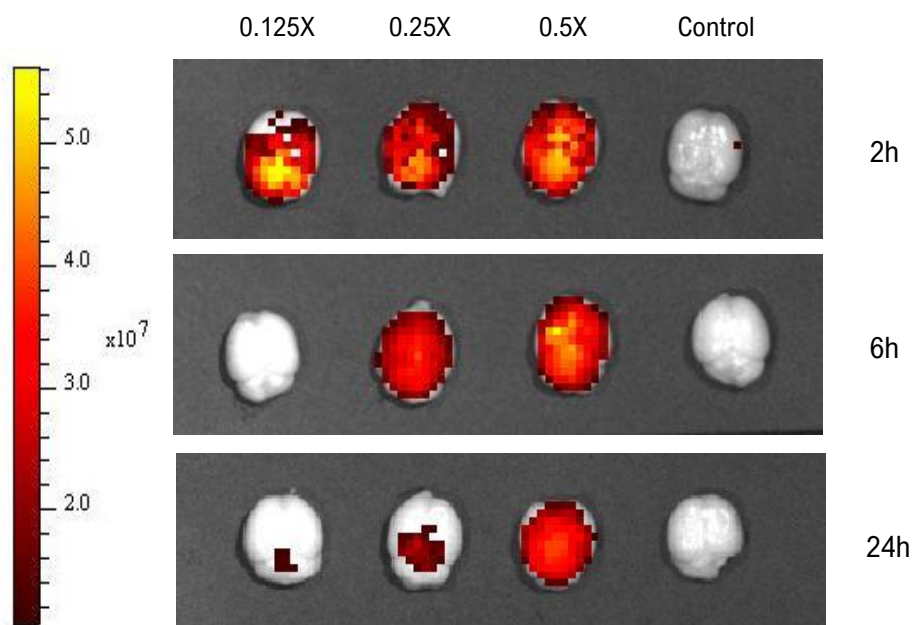


Figura A 18: Fluorescencia ex vivo evaluada durante la prueba de ajuste de dosis para protocolo de administración de nanopartículas en ratones de experimentación. Se observa una acumulación en cerebro cuya intensidad va disminuyendo en el tiempo. Se observan intensidades superiores a las mayores dosis evaluadas. Aunque los datos de la figura A16 sugieren detectabilidad apropiada con todas las dosis evaluadas, los datos de fluorescencia *in vivo* sugieren que para el caso de nanopartículas sin funcionalizar, la dosis de 0,125X puede resultar en poca acumulación en cerebro por debajo de la sensibilidad deseada para la prueba. Por lo tanto, se decide continuar con el desarrollo del protocolo de administración aplicando una dosis de 0,25X respecto a la concentración del prototipo de referencia.

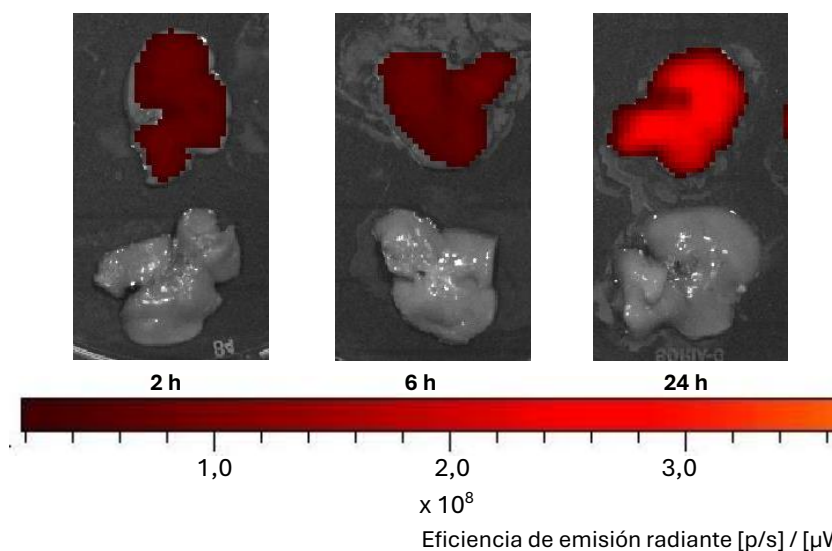


Figura A 19: Acumulación de nanopartículas sin funcionalizar en hígados de ratones 2, 6 y 24 horas post-administración. Se muestran los datos de intensidad de fluorescencia ex vivo de hígados extraídos de ratones sacrificados a las 2, 6 y 24 horas después de la administración de nanopartículas. Se observar un aumento progresivo de la acumulación en el hígado con el paso del tiempo. Previo a su sacrificio, cada animal fue perfundido con PBS 1X para eliminar la sangre de los vasos sanguíneos, asegurando que las mediciones solo incluyen material que se haya acumulado en el tejido.

Size Distribution Report by Intensity

v2.2



Sample Details

Sample Name: 22-PSE0-049 2

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: MFMPSD.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 634	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,45	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,000	Measurement Date and Time: miércoles, 15 de junio de 2...

System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 50
Count Rate (kcps): 91,9	Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 11

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 85,90	Peak 1: 93,62	100,0	24,97
Pdl: 0,111	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,918	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality **Refer to quality report**

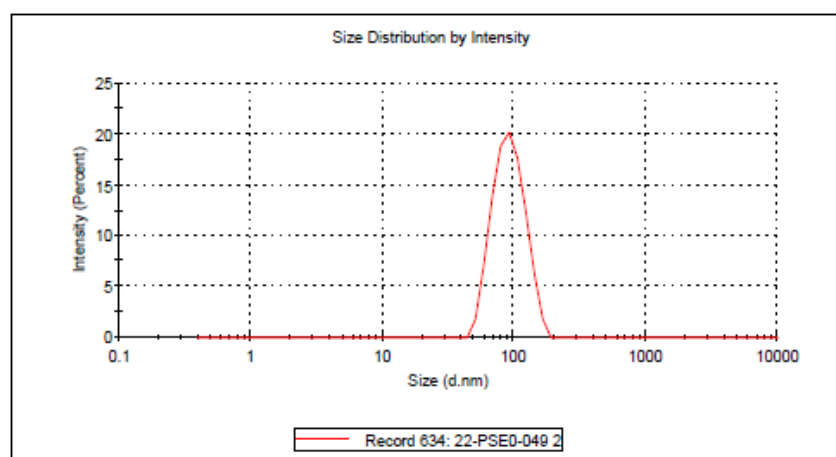


Figura A 20: Reporte de distribución de tamaño de nanopartícula de un lote de nanopartículas funcionalizadas con el péptido MiniAp-4. Se ilustran los resultados de un lote con un tamaño de partícula de 85,90 nm cuya curva de tamaños se extiende desde los 21,04 nm hasta los 255,0, con alrededor de un 23% de las mediciones por debajo de los 50 nm.

Anexo 2: Publicaciones realizadas en revistas indexadas

Anexo 2-1

Vargas R, Romero M, Berasategui T, Narváez-Narváez DA, Ramirez P, Nardi-Ricart A, et al. Dialysis is a key factor modulating interactions between critical process parameters during the microfluidic preparation of lipid nanoparticles. Colloids and Interface Science Communications [Internet]. 2023;54(March). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2023.100709>
[cuerpo principal del artículo]



Rapid Communication

Dialysis is a key factor modulating interactions between critical process parameters during the microfluidic preparation of lipid nanoparticles

Ronny Vargas^{a,b}, Miquel Romero^a, Tomás Berasategui^a, David A. Narváez-Narváez^a, Patricia Ramirez^c, Anna Nardi-Ricart^a, Encarna García-Montoya^{a,d}, Pilar Pérez-Lozano^{a,d}, Josep M^a Suñe-Negre^{a,d}, Cristina Moreno-Castro^e, Cristina Hernández-Munain^f, Carlos Suñe^{e,*}, Marc Suñe-Pou^{a,d,**}

^a Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Costa Rica, San José, Costa Rica

^c School of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, University of Costa Rica, San Jose, Costa Rica

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

^e Department of Molecular Biology, Institute of Parasitology and Biomedicine "López-Neyra" (IPBLN-CSIC), Granada, Spain

^f Department of Cell Biology and Immunology, Institute of Parasitology and Biomedicine "López-Neyra" (IPBLN-CSIC), Granada, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Design of experiments
Quality by design
Purification
Process interactions
Ethanol injection method
Rapid mixing
Design of space

ABSTRACT

Manufacturing lipid nanoparticles through microfluidic mixing can be approached from a Quality by Design perspective. Research involving critical process parameters seems to focus on the total flow and flow rate ratio, thus other process variables, such as dialysis, are underestimated. This study used a Design of Experiments to identify the influence of critical process parameters on particle size, polydispersity index, and zeta potential. A response surface Design of Experiments modeled the influence of: total flow (400 to 4000 $\mu\text{L min}^{-1}$); flow rate ratio (3 to 9) and dialysis (yes/no). Results suggest that dialysis is a crucial parameter that strongly influences particle size and zeta potential and moderately affects polydispersity index. The flow rate ratio's relevance decreases when dialysis is performed. As the purification method can change the influence of other process parameters, it should be an integrated part of the microfluidic manufacturing of lipid nanoparticles instead of an extra step.

1. Introduction

Lipid nanoparticles (LNPs) are versatile drug delivery systems with a wide range of therapeutic and diagnostic applications [1–4]. In fact, LNPs are the most clinically advanced nonviral vector for nucleic acid delivery [5]. Microfluidic mixing methods (MFMs) have been developed in recent years and have become among the most effective methods for LNPs manufacturing [5–9]. Through MFMs, small volumes of ethanolic lipid solutions are continuously mixed into aqueous buffered solutions inside a microscale chip, coupled to a flow control mechanism [4,6,10,11]. This process causes rapid and homogeneous lipid

nucleation, generating small and uniform LNPs [6,12] with high encapsulation efficiency and exhibiting high scale-up possibilities and high batch-to-batch reproducibility [7,13]. The development of LNPs using MFMs has previously been performed from the perspective of Quality by Design (QbD) [14–19]. According to QbD, the quality profile of a product must result from the establishment of a design of space since the early stages of conceptualization in pharmaceutical development. This design of space provides an extensive understanding of how the critical quality attributes (CQA) of a product are affected by the critical material attributes, and the critical process parameters (CPP) and their interactions [20,21]. Although the enhanced application of QbD in the

Abbreviations: CART, Classification and regression trees; CPP, Critical process parameter; DoE, Design of Experiments; CQA, Critical quality attribute; FRR, Flow rate ratio; LNPs, Lipid nanoparticles; MFMs, Microfluidic mixing methods; N/P ratio, Nitrogen to phosphate ratio; PDI, Polydispersity index; PSD, Particle size distribution; QbD, Quality by design; QTPP, Quality target product; TF, Total flow.

* Corresponding author.

** Corresponding author at: Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

E-mail addresses: csune@ipb.csic.es (C. Suñe), marcsune@ub.edu (M. Suñe-Pou).

<https://doi.org/10.1016/j.colcom.2023.100709>

Received 15 March 2023; Accepted 2 April 2023

2215-0382/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

pharmaceutical development process of new medicines is not mandatory, it represents some regulatory advantages, especially in terms of flexibility for postapproval changes [22,23]. The financial and scientific advantages of QbD implementation are recognized by regulatory authorities and pharmaceutical companies worldwide [24]. Design of Experiments (DoE) is among the most commonly used QbD tools for exploring the design of space and optimizing the response of LNPs manufacturing by MFMs [7,17,25].

CQA normally reported for LNPs are those related to their ability to penetrate target cells and exhibit a therapeutic effect, such as: particle size distribution (PSD), polydispersity index (PDI), morphology, surface charge, encapsulation efficiency, stability, drug release [26–28], cell permeability and targeting efficacy [21]. On the other hand, the academic attention on CPP for MFMs seems to be focused on only the following parameters: total flow (TF) and the aqueous to lipid flow ratio, or flow rate ratio (FRR), as exemplified in Fig. 1.

Despite the extensive academic production that applies DoE to LNPs manufacturing, several authors state that QbD principles must be further implemented from a manufacturing perspective [21,25,29–31]. In particular, some authors identified an insufficient control and understanding of parameter interactions [7,17]. Although TF and FRR are important variables in the process of MFMs, the approach shown in Fig. 1 seems to underestimate other process variables that could affect the quality of LNPs, as nanoparticle properties are highly dependent on the possible interactions between variables [21]. Whereas those less studied parameters must be somehow controlled or defined in LNPs manufacturing by MFMs, their exclusion in experimental designs could antagonize the QbD philosophy. This could lead to the establishment of design spaces that exclude areas that may significantly contribute to the variability of effects. Among others, Fig. 1 points to the dialysis, or any other purification process, as an input variable not typically considered CPP.

Dialysis (as a purification technique) is usually necessary for the clinical or experimental application of LNPs obtained by MFMs [9,16]. In particular, purification is necessary to remove ethanol from the medium and thus allow the preparation to be used in cell cultures or in studies with laboratory animals [32]. Despite the importance of the process, a systematic underestimation of dialysis as CPP is suggested, as shown in Fig. 1. The lack of consideration of dialysis in experimental designs has previously attracted the attention of several authors. It has been suggested that dialysis should not be seen as an isolated operation, specifically for changes in PSD after the purification process [9,33–35]. Although some published works include the application of dialysis as a

fixed factor [17,33,36,37], only a few authors include this process as a variable in their experimental design. For example, Terada *et al* showed an increase in the PSD after dialysis and claimed that the neutralization method is important to achieve their target dimensions of the nanoparticles [16]. More drastically, Kulkarni *et al* concludes that the LNPs size is more affected by the conditions of the dialysis process (particularly pH) than the mixing conditions in the previous step [35]. Nevertheless, from an interactions point of view, the study remains an opportunity to broaden the knowledge and understanding of CPP's integrated impact on the MFMs of LNPs.

This study seeks to determine the influence of the dialysis process in describing the CQA (PSD, PDI and zeta potential) of LNPs from a QbD perspective. Our approach seeks to understand the direct effect of dialysis and its possible interactions with TF and FRR. We used DoE to describe and model the response and quantify the relative influence of each CPP in the description of variability. The inclusion of the dialysis process in the experimental design yielded new evidence of how it can model the influence of TF and FRR, typically tested manufactured conditions. With the aid of the regression model, we demonstrate the importance of the purification process as a CPP that should be incorporated into experimental designs since the early stages of formulation development.

2. Experimental section

2.1. Materials

DOTAP [1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, chloride salt] was purchased from Nanosoft Polymers. DSPC [1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine] was purchased from Avanti Polar Lipids. Cholesterol was purchased from Sigma Aldrich. DSPE-mPEG2000 [1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]] was purchased from MuseChem.

2.2. Lipid nanoparticle preparation

LNPs were prepared following the ethanol injection method in a microfluidic system [5,16,38]. Specifically, we mixed ethanol and aqueous phases using a microfluidic polycarbonate chip with the aid of a pressure flow controller. We used a staggered herringbone chip with a channel depth of 200 μm (FLUIDIC 187, Chipshop, Germany) and a pressure flow controller (OB1 MK3+, Elvexys, France / Inside Therapeutics, France). The TF tested was in the range between 400 and 4000

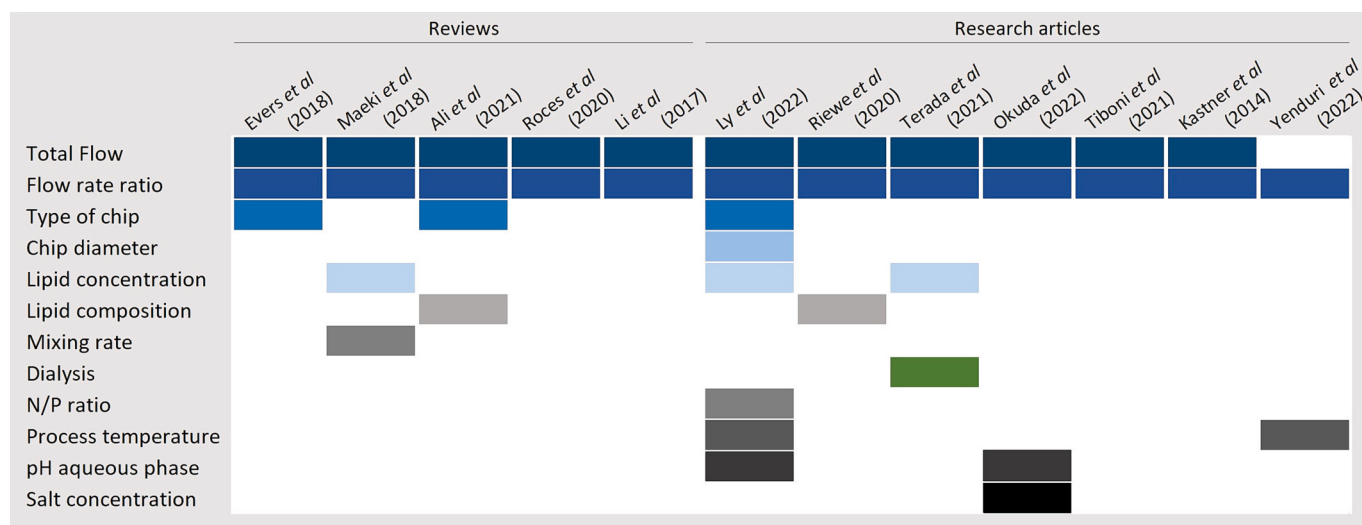


Fig. 1. Process variables in microfluidic mixing preparation of lipid nanoparticles. Reported as critical process parameters in reviews, or included with at least two levels in experimental designs in research articles. N/P ratio = nitrogen to phosphate ratio.

mL min^{-1} , while the FRR was between 3 and 9.

For the ethanol phase, lipids were dissolved in ethanol at total lipid concentration of 2.5 mM. The lipid proportion was 40/10/48.5/1.5 (DOTAP/DSPC/cholesterol/DSPE-mPEG2000). The aqueous phase consisted of 1 mM citrate buffer (pH 5.3).

When needed, ethanol removal was performed using a 0.5–3 mL dialysis cassette with a 10,000 molecular weight cutoff (Slide-A-Lyzer®, Thermo Scientific, USA). Each dialysis cassette was filled with 3 mL of LNPs suspension and dialyzed against 400 mL of 0.1 M KCl for at least 18 h under continuous stirring at room temperature. The dialysis was conducted in three consecutive steps with renewal of the purification fluid in between. LNPs were dialyzed for 2 h in the first and second steps and continued overnight for the third step.

2.3. LNPs characterization

PSD and PDI were determined from the hydrodynamic diameter measured by dynamic light scattering on a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). Surface charge (zeta-potential) was measured by laser Doppler microelectrophoresis in a Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments, UK).

2.4. DoE design and statistical analysis

A response surface central composite design of experiments modeled the influence of the selected variables of operation as follows: total flow (400, 2200 and 4000 $\mu\text{L min}^{-1}$); flow rate ratio (3, 6 and 9) and dialysis as a categorical variable (yes or no). The fixed variables were 2.5 mM lipid content; an aqueous buffer concentration of 0.01 mM; and 0.1 M KCl dialysis solution. All experiments were executed at room temperature. The experimental design consisted of 1 base block and 22 base runs in 3 replicates, for a total of 66 runs in 3 blocks: 24 cube points, 24 axial points and 18 center points. The experimental data were analyzed with the statistical software Minitab 19.1 (Minitab Inc. USA). $P < 0.01$ was considered to indicate statistical significance. When necessary, Johnson transformations were applied to data that were not normally distributed.

Multiple regression analysis with least-squares assessment and analysis of variance allowed us to identify the statistical significance of factors (TF, FRR and dialysis) describing the variability of PSD, PDI and zeta potential of empty LNP. The regression model enabled the prediction of optimal parameter configuration as well as response prediction for hypothetical scenarios. The goodness-of-fit and predictive accuracy of the model were evaluated using residual plots, and R^2 and R^2 -predicted values. To further evaluate the variance and correlations of data, we used Minitab 19.1 to obtain classification and regression trees (CART) [39], and to perform a principal components analysis [40].

3. Results and discussion

The Design of Experiments conducted in this study allowed us to model the influence of the operational variables on some physico-chemical attributes of lipid nanoparticles produced by microfluidic mixing. The surface response experimental design described and modeled the impact of total flow, flow rate ratio and dialysis process on the particle size distribution, zeta potential and polydispersity index. The correlations among variables are also supported by principal component analysis presented in the supplementary information (Figs. S1 and S2) and the CARTs presented in Fig. 5, and figs. S10 and S11 (supplementary information). The results suggest that the role of dialysis in the modeling of critical quality attributes could be more relevant than demonstrated in the traditional approach and thus, highlight its importance as a critical process parameter.

3.1. Effects on particle size distribution

In our experimental conditions, dialysis caused a reduction in the

analytical outcome of particle size distribution. The contour plot presented in Fig. 2 shows a greater area for mean particle sizes lower than 36 nm when dialysis is conducted (right side of the chart); in addition, mean sizes higher than 60 nm are not observed when the purification process is applied.

Notably, Fig. 2 provides insight into the interaction between the dialysis process and the FRR. When comparing the contour plot with and without dialysis, the contour lines almost verticalize. Therefore, at specific TF values, the observed mean particle size is constant regardless of the FRR when dialysis is conducted, contrary to the system behavior at the same TF values without dialysis. Thus, Fig. 2 allows a better understanding of the FRR influence within the design of space. One possible implication of this result could be that including dialysis from the early screening stages of LNPs development might prevent the FRR contribution from being overrated.

More broadly, Fig. 3A compiles the combined effect on particle size distribution of all variables of operation included in the experimental design. Consistent with reported data in the literature, the size of nanoparticles tended to reduce at higher TF and FRR values. The reason for that influence is commonly attributed to higher mixing rates, which lead to a minimal size based on the lipid constituents. Additionally, the error bars in Fig. 3A and Fig. S4 (supplementary information) suggest less variability between purified samples. This observation suggests that dialysis could play a role in enhancing process repeatability, which is consistent with our observation for the preliminary screening tests. In those previous experiments, the PSD in 60 observations of LNPs manufactured with the same TF and FRR showed a relative standard deviation of 7.33% for unpurified samples, and 4.61% for purified samples (data not shown).

The statistical relevance for the differences and interactions mentioned above are supported by the regression model ($R^2 = 0.87$) results summarized in Table S1, the data in Fig. 4 and the verifications detailed in table S2, and Figs. S5, S6 and S7 (supplementary information). TF, FRR, and dialysis exhibited a statistically significant effect on particle size distribution ($p = 0.000$). According to the adjusted mean squares and the chart of standardized effects (Fig. 4A), TF provides the greatest contribution when describing the variability of PSD. The dialysis process is the second relevant factor, above the contribution of the FRR. This observation contrasts with the traditional approach to control TF and FRR above any other process variable.

Consistent with the observations in Fig. 2, the ANOVA results for PSD also showed a significant interaction between dialysis and FRR, as well as TF and FRR. To our knowledge, this is the first study to model and demonstrate those interactions. According to the interaction plot shown in Fig. 4B-iii, the expected mean particle size at the highest FRR tested is comparable with and without dialysis, but there is a difference at lower FRR, with higher mean sizes for unpurified samples. This demonstrates that including dialysis as an extra step (detached of any optimization process) could cause the FRR effects extracted from the previous optimization experiments to be misinterpreted.

The TF*FRR interaction is less evident and joint interpretation with the p -value in Table S1 and Fig. 4A is necessary to derive conclusions about their statistical significance, which is the lower than the other factors. Moreover, Fig. 3A shows a change in the FRR effect for the dialyzed samples with 400 mL min^{-1} and 2200 mL min^{-1} (the gray and light blue bars in the right part of Fig. 3). As the TF*FRR interaction is more marked in dialyzed samples, it is possible that some authors did not notice the interaction, and it probably offers one explanation of why the design of spaces in MFMs does not usually explore areas of interaction.

In a complementary way, we also used CART to illustrate and evaluate the correlations between factors. Utilizing CART allows a more intuitive representation of the design of spaces, providing a graphic interpretation of the data effects and order of contribution. Fig. 5 provides an additional illustration for the reduction in FRR relevance with the dialysis process and TF. A comparison of nodes 6 and 9 with node 4

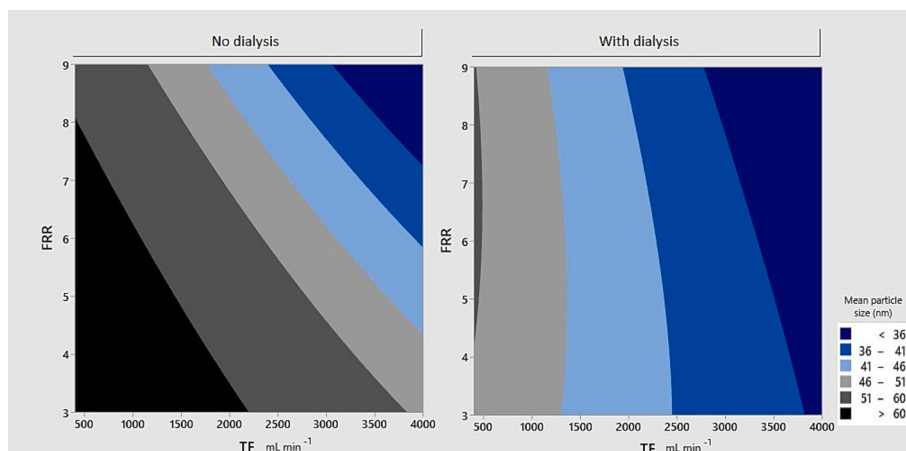


Fig. 2. Contour plot of the particle size distribution of lipid nanoparticles. The introduction of dialysis changes the combined effect of total flow (TF) and flow rate ratio (FRR) on the size of the nanoparticles. The purification process involves lower mean particle sizes and a reduced influence of the FRR value.

shows how the high TF values change the way in which dialysis reduces the FRR effect. The CART on PSD also supports the above-discussed observations on how dialysis could be a key to reduce the process variability, as fewer nodes were observed for dialyzed branches, with smaller standard deviation values.

One possible mechanism that explains why the dialysis impacts the size of LNPs is related to the phenomenon of Ostwald ripening [15,41]. Nanoparticles undergo this mechanism as the smaller particles fuse after the rapid-mixing procedure [35]. The presence of ethanol decreases the stability of lipid membrane, facilitating nanoparticle fusion and high PSD when dialysis is not performed [9]. Furthermore, exchanging the medium with one that contains a higher ionic content will increase the electrostatic repulsion LNPs, reducing the possibility of particle fusion, following the Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek theory regarding the stability of hydrophobic colloid dispersions [33]. In our study, PSD showed a decrease with dialysis, similar to the results obtained by Hibino *et al* [34]. On the other hand, Terada *et al* reported an increase in the size of nanoparticles with dialyses. They hypothesized that the neutralization of cationic lipids decreases nanoparticle repulsion [16]. As both the cationic lipid and the dialysis medium were different in the Terada *et al* and ours, the difference in the direction of the dialysis effect suggests that other variables, such as the type of lipid, and dialysis medium composition could also play a transcendental role in the mechanism of particle fusion. These observations should be considered in studies that involve a further expansion in the design of space.

3.2. Effects on zeta potential

The zeta potential results point to dialysis as the most critical process parameter for that CQA, and show an interaction between the purification process and the FRR. Fig. 3B suggests that the dialysis process exerts a strong influence on the increase in zeta potential, while the FRR showed opposing trends depending on whether the purification process was conducted. In a supportive way, the regression model summarized in Table S1 ($R^2 = 0.83$) indicates statistical significance for dialysis and for the previously mentioned interaction between FRR and dialysis ($p = 0.000$). The adjusted mean squares from Table S1 and Fig. 4C highlight dialysis as the factor that considerably explains most variation, followed by the interaction of dialysis with FRR.

Table S1 and Fig. 4C also indicate a statistically significant effect on zeta potential for TF ($p = 0.000$), although its effect may not be evident in Fig. 3B. This is probably because TF exhibits an adjusted mean square 16 times lesser than that of dialysis, which means its contribution to describing the variability of zeta potential is considerably less significant. However, it appears that TF caused a slight reduction in the zeta potential value as the flow increased, as shown in Fig. 4D. This trend is

also more evident in the main effects plot on zeta potential (Fig. S3—B, supplementary information), and by charting the average zeta potential only by total flow (Fig. S8, supplementary information). In addition, CART in Fig. S10 illustrates the TF relevance in dialyzed and low-FRR conditions.

An additional analysis of Fig. 4D could emphasize the importance of parameter interactions in zeta potential values. There are minimal differences in zeta potential in Fig. 4D-i, in which the dialysis effect is not considered. On the other hand, there are considerable differences in the mean zeta potential values by TF and FRR values when the dialysis effect is analyzed. In particular, the FRR*dialysis plot (Fig. 4D-iii) shows opposite effects for FRR with and without dialysis. Those opposite effects are averaged in the complete design, which is why FRR shows no significant effect in Table S1 and Fig. 4C. The effects shown in Fig. S10 (supplementary information) could clarify any possible confusion regarding the relevance of FRR on zeta potential, specifically of the clarification occurs through observing the splitting after nodes 2, 3, 4 and 6 (4 out of 7 split nodes). In addition, the analysis of only the dataset including dialysis (represented in Fig. S9, supplementary information) showed significant effects for FRR on zeta potential, with a higher contribution than that of TF. The opposite effects of FRR also support the theory that if dialysis is added as an extra step, the knowledge gathered in optimization studies without dialysis may become insignificant.

The strong influence of dialysis on the zeta potential could be explained by the change in dialysis medium composition. During dialysis, ethanol and the original aqueous buffer were substituted by a new medium. This medium could change the zeta potential, as it contains different saline composition and exhibits different ionic strength and pH values [42]. To increase DoE robustness, further studies should be carried out, including studies with different levels of composition and concentrations of dialysis medium. In addition, the changes in the zeta potential could contribute to variation in PSD due to the electrostatic repulsion and particle fusion modulation theory previously mentioned [33,42].

3.3. Effects on polydispersity index

The data for the polydispersity index differ from those observed for the PSD and zeta potential. The most important difference is the nonlinear behavior evidenced by the significant effect for the quadratic factor FRR*FRR shown in Table S1 and Fig. 4E, and the low value for the R^2 of the regression model (0.50). The lack of linearity is also shown in the curvature of each individual effect line from the interaction plot for PDI in Fig. 4F, and in Fig. S3—C (supplementary information). This behavior could be a consequence of PDI being a parameter of relative dispersion, which is affected by the standard deviation of data and the

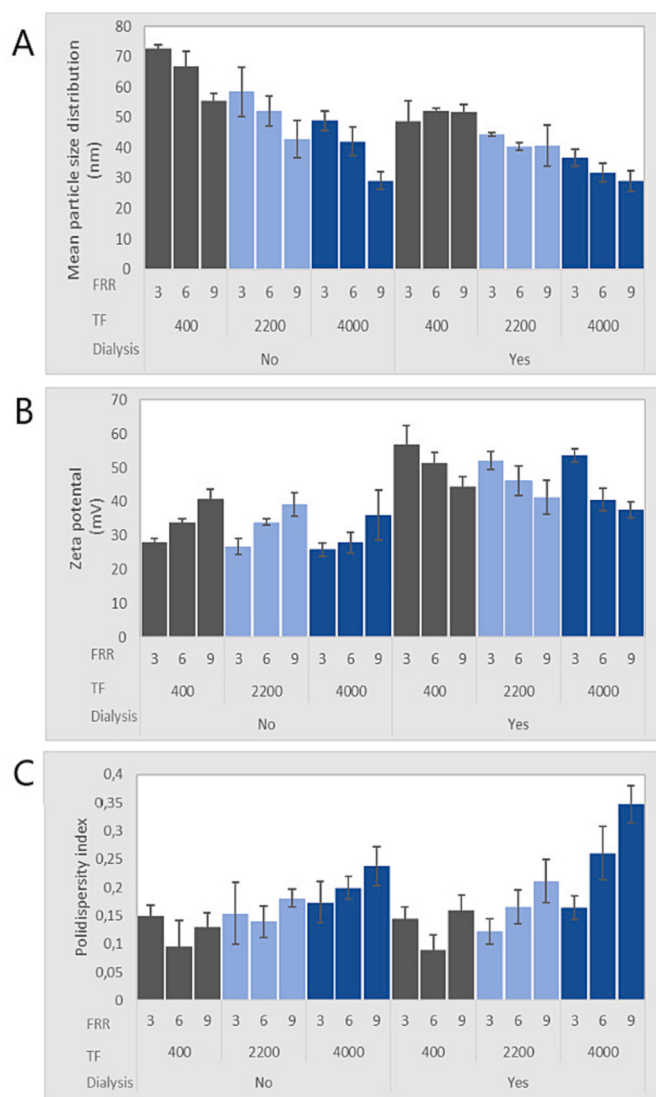


Fig. 3. Effect of each variable of operation on the mean values of the critical quality attributes assessed. Gray bars correspond to the 400 mL min⁻¹ samples, light blue to 2200 mL min⁻¹ and dark blue to 4000 mL min⁻¹. A) The particle size distribution (PSD) showed a tendency to decrease with higher total flow (TF) and flow rate ratio (FRR) values. Dialyzed samples showed lower PSD and less variability. B) The dialyzed samples showed higher zeta potential values. Flow rate ratio (FRR) differences showed opposite trends with and without dialysis; while total flow (TF) exhibited a less evident effect on reducing zeta potential (additional representation in Fig. S10). C) Polydispersity index (PDI) changes on the flow rate ratio (FRR) showed a different trend at 400 mL min⁻¹, compared to 2200 and 4000 mL min⁻¹, suggesting an interaction between those two variables. Fig. S3A in supplementary information provides additional visualization of main effects for each quality attribute. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

mean particle size values [28,43,44]. Due to the lack of linearity, the interpretation of the PDI outcomes shown in Fig. 3C might not be as intuitive as the PSD and zeta potential results.

However, based on the DoE results from Fig. 4E, Fig. S11, and Table S1, we determined that TF is the factor with the highest contribution when describing PDI variability, followed by the FRR and TF-FRR interactions. Thus, the traditional approach that focuses on TF and FRR might provide a better fit for describing the behavior of PDI, unlike the observed for PSD and zeta potential. Regarding the interaction, Fig. 4F-i shows that the differences in PDI among FRRs impact the PDI values at

high TF values, which are expected to cause smaller particle sizes. Thus, it is possible that the increase in PDI influenced by the high FRR is more due to the decrease in the mean particle size than by the dispersion itself.

The effects of dialysis illustrated the CART presented in Fig. S11 (supplementary information) could also support the hypothesis that PDI is affected by smaller particle sizes, instead of the dispersion itself. The dialyzed terminal nodes show the highest PDI values of their respective subbranches, and it was previously discussed that the dialysis process shows a strong influence decreasing PSD with relatively low standard deviation on particle size. More studies are needed to determinate the mechanisms of PDI correlations; this is especially true for relatively low particle sizes, which could lead to higher PDI values even with similar ranges of dispersion. To perform a deeper evaluation, additional DoE with more levels are needed to include nonlinear relationships and clarify the integrated effect on PDI. It is possible that the conclusions for PDI could change as more description and correlation are added to the model. In particular, due to the presence of standardized effects close to the line of significance (Fig. 4E) and the low accuracy of the regression model ($R^2 = 0.50$).

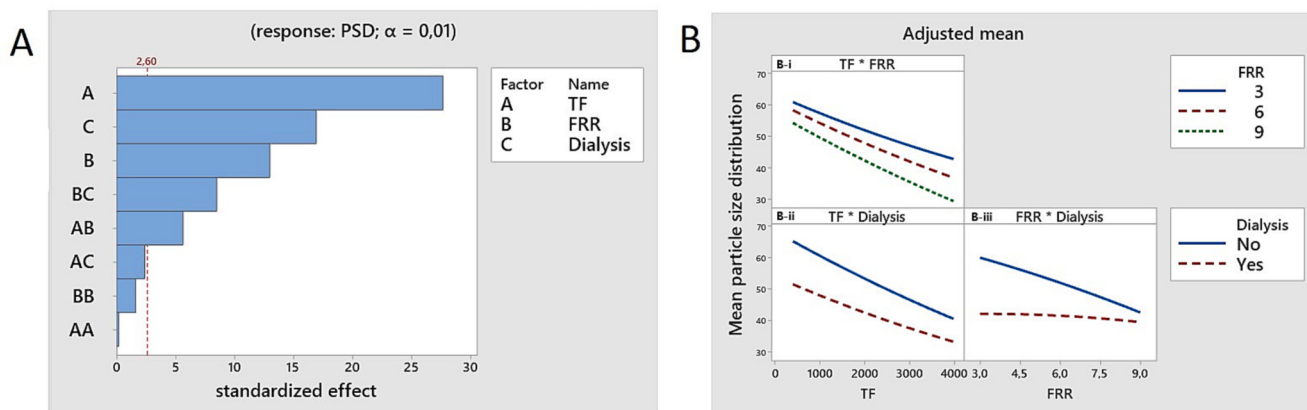
3.4. Implications for the quality by design development of lipid nanoparticles

When performing a QbD approach, the purification requirement should be defined from the very first step in the process, i.e., specification of the quality target product profile (QTPP) [45]. As the necessity to include a purification method depends on the biological application of LNPs and the incompatibility of ethanol content, it is arguably possible that some authors could include the purification step only when the formulation process has moved toward biological evaluation; this possibly occurs after screening or optimization experiments including TF and FRR. This could be particularly reasonable given the limited attention that purification has received as CPP in the QbD literature. However, the evidence of direct and interactive effects of dialysis revealed in this study suggests that such latter inclusion could lead to additional testing and adjustments in the development process. In the best cases, the quality profile of the LNPs would result from chance and not through knowledge of how CPP affects CQA. Thus, excluding the dialysis effect in the design of space exploration could be considered a quality-by-testing approach.

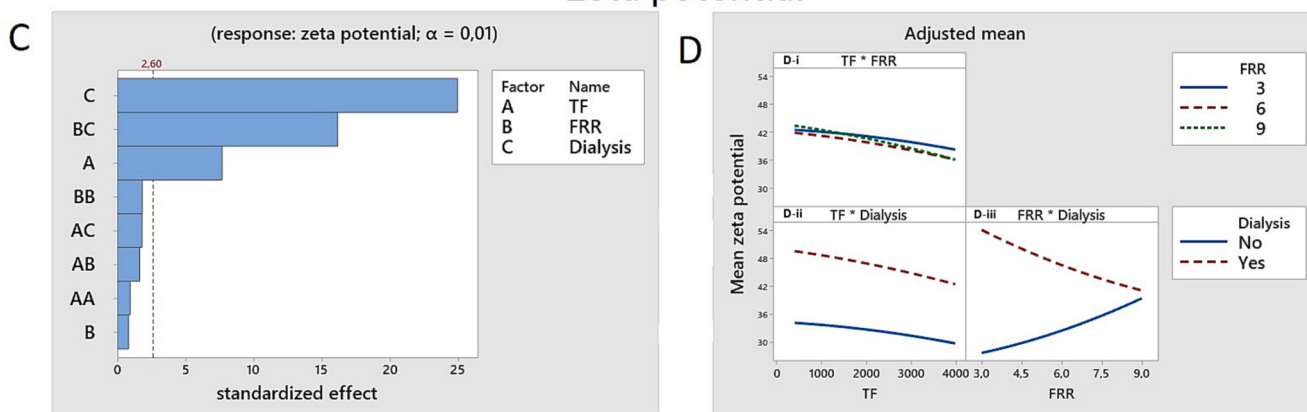
By considering our formulation in a hypothetical design of space without the dialysis data, the possible implication on LNPs design is illustrated. Table 1 represents a response optimizer for two different approaches. The first design of space (DS1) corresponds to the complete design shown in this study. The second one (DS2) is a hypothetical and more limited design of space, as if only TF and FRR were evaluated without considering dialysis for this exploratory stage.

Table 1 illustrates how the same formulation and a relatively similar experimental procedure (except for the inclusion of dialysis) could lead to two different LNPs systems. From the manufacturing point of view, the formulation from DS1 would have a higher lipid concentration than that obtained from DS2 (as a high FRR implies that the ethanolic phase is more diluted). Additionally, both hypothetical formulations will show different PDI and zeta potential values. Moreover, the formulation from DS2 probably must undergo dialysis at some point. It is not possible to predict the PSD, PDI and zeta potential values if only the DS2 regression model is considered. The effect of this subsequent change will be a source of uncertainty until the change is executed and tested. On the other hand, having the complete data set and the regression model of DS1 allows us to predict the results for the inclusion of dialysis to the configuration of TF = 2181.82 mL min⁻¹ and FRR = 9. The PSD for that inclusion of dialysis would be 39.51 ± 8.48 nm, PDI of 0.239 ± 0.071, and zeta potential of 41.15 ± 8.16 mV. All CQA attributes are different from those expected for any two proposed scenarios. As previously discussed, the knowledge gained from the optimization studies without any purification method may become irrelevant after performing

Particle size distribution



Zeta potential



Polydispersity index

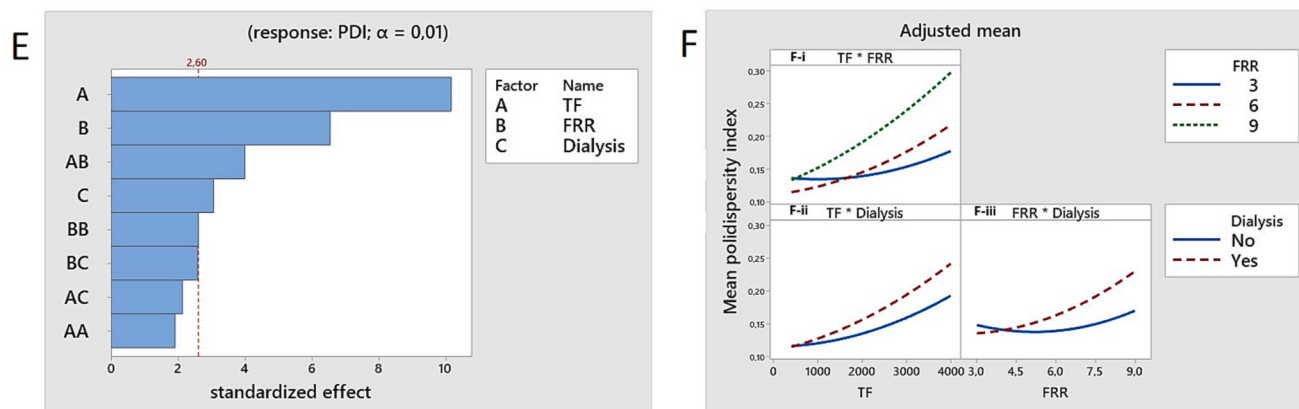


Fig. 4. Pareto charts for standardized effects and interaction plots of each critical quality attribute from the surface response design. A) Standardized effects for particle size distribution (PSD) show significant effects for total flow (TF), dialysis, flow rate ratio (FRR) and the interactions between FRR*dialysis and TF*dialysis (in descending order of contribution). B) Interaction plot for PSD. The nonparallel lines in the bottom right panel (B-iii) represent the strong interaction between FRR and dialysis. The red lines in B-iii show almost no difference between FRR values, while the blue lines show a decrease in PSD as the FRR values increase. To interpret the less evident interactions for B-i and B-ii joint observation with the results shown in Fig. 4A and Table S1 must be performed. C). The standardized effects of dialysis, the dialysis*FRR interaction and TF showed significant effects on zeta potential (in descending order of contribution). D) The lines in D-iii (converging at high FRR values) show a strong interaction as the FRR effects depends on the dialysis process. Panels D-i and D-ii are almost parallel representing no interaction between factors. E) The standardized effects for the polydispersity index (PDI) shows significant effects for TF, FRR, the TF*FRR interaction, dialysis and the quadratic effect of FRR (in descending order of contribution). The value of the standardized effect for FRR*FRR is 2.6117 (significance limit at 2.600), while the value for the dialysis*FRR interaction is 2.59281. F) Panel F-i shows a strong interaction between TF and FRR. In particular, the more evident differences can be seen at an FRR of 3. Although panels F-ii and F-iii may suggest an interaction for TF*dialysis and FRR*dialysis, joint observation with Fig. 4E and Table S1 results are necessary for interpretation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

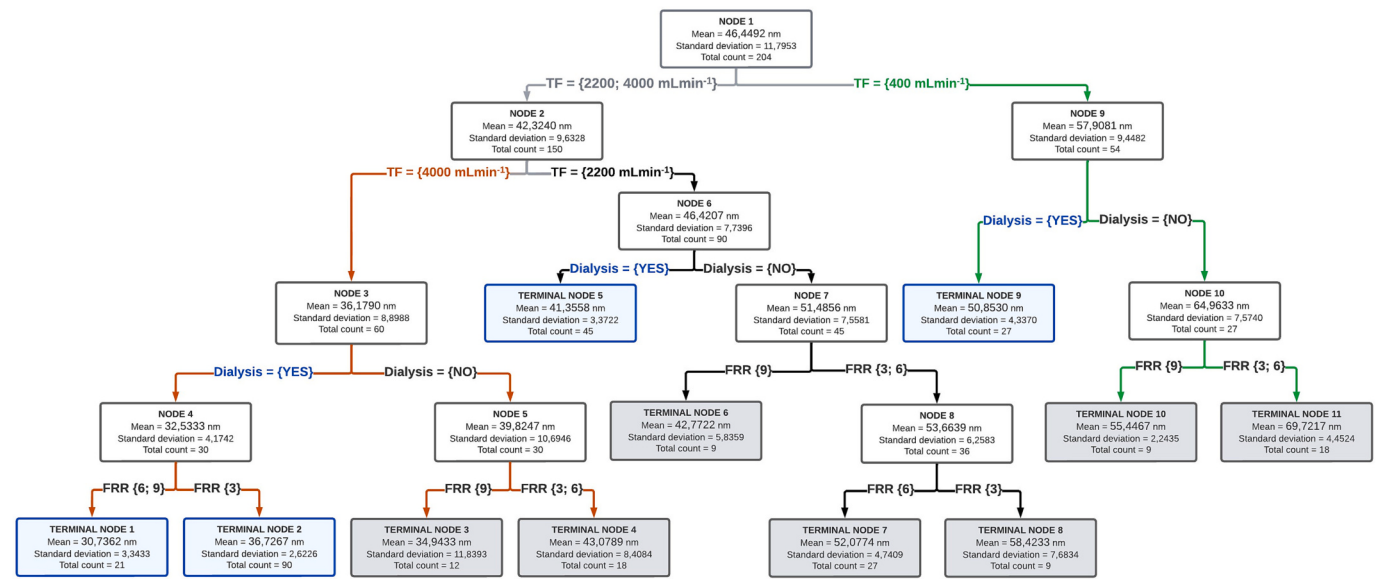


Fig. 5. Classification and regression tree for the particle size distribution. The effects of total flow (TF), dialysis and flow rate ratio (FRR) are shown. The orange, black and green lines represent the branches from the 4000 mL min⁻¹, 2200 mL min⁻¹ and 400 mLmin⁻¹, respectively. The primary splitting by TF indicates that TF provides the highest contribution when describing the variability in PSD data. Each TF branch splits into dialyzed and undialyzed subbranches. Notably, performing dialysis led to a terminal node for low and mid TF values, regardless of the FRR value. Significant differences by FRR are seen only at the highest TF (4000 mL min⁻¹) and for unpurified samples. The light blue boxes (the dialyzed terminal nodes) show lower standard deviation values than those of the gray boxes (unpurified terminal nodes). Additional CART for zeta potential and polydispersity index are presented in supplementary information. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
Response optimization minimizing PSD and PDI for two scenarios with and without the inclusion of dialysis as part of the optimization studies. Optimization was performed to minimize the PSD and PDI, and maximize the zeta potential.

Scenario	Variable configuration			Predicted response		
	TF (mL min ⁻¹)	FRR	Dialysis	PSD (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
DS1. Optimize with dialysis (full design) ¹	1829,72	3	Yes	43,35 ± 1,70	0,129 ± 0,071	54,72 ± 8,16
DS2. Optimize without dialysis ²	2181,82	9	Not included	42,64 ± 1,66	0,169 ± 0,014	39,46 ± 8,15

Note: 1- Regression model for DS1 includes all the data shown in Table S3 (supplementary information). 2- DS2 only includes half of the Table S3 data ("No" dialysis data).

dialysis as an additional step. In similar cases, any subsequent modification in the process after dialysis is performed will require additional testing and resources to predict, evaluate, and address process variability in accordance with QbD.

QbD must identify, explain and manage all sources of variability [46]. As dialysis effects have now been identified and explained in terms of their interaction with TF and FRR, our suggestion is that dialysis or any other suitable purification method should be included in the formulation process from the early stages, even if the biological applications are postponed until later development stages.

Dialysis is a widely used technique for nanoparticle purification despite some disadvantages such as: potential loss of the loaded drug, batch-size dependency or being a time-consuming method. The impact of dialysis and its variables should be carefully monitored to minimize any possible negative effect. Particularly, the selection of the dialysis membrane, time, and volume of dialysis buffer should be optimized in terms of their effect in the loading capacity and stability. We acknowledge that alternative purification techniques, such as ultracentrifugation, size-exclusion chromatography or filtration techniques could be preferred for a given formulation depending on the specific balance of advantages or disadvantages. Regardless the selected method, we encourage other authors to apply such purification methods with caution in order to not underrate any potential interactions, as we have

stated in our study.

Regarding other possible variables on LNPs preparation, it is highly possible that some other process variables excluded from this study could also exert an interactive effect similar to dialysis, given the high data interconnection observed in the DoE and the principal component analysis. Thus, the parameter interactions could be underestimated, as previously discussed. Even our conclusions could change if higher contributions appear, as more parameters are included in more than one level.

Therefore, more research work that includes more process parameters is needed. More knowledge about interactions would provide a more robust design of spaces. The work of Ly *et al* [17] is among the most parameter-extensive studies included in Fig. 1. Interestingly, they did not include purification method as a factor in the experimental design. However, their approach in two iterations DoE could be used as a reference for reducing the number of experimental runs that are needed as more factors are incorporated. Our observations could be used as references for further evaluations, as well as the observations on lipid content from Terada *et al* [16] and lipid composition from Tiboni *et al* [37].

There is also a research opportunity to focus on the dialysis variables. From a process perspective, dialysis involves several variables that might be sources of variation. Consequently, it is possible to establish an

even broader design of spaces considering different levels of: dialysis medium composition or concentration, different dialysis times and the effect of latency times before dialysis. Further research is needed including different methods of purification such as ultracentrifugation, size-exclusion chromatography or filtration techniques.

Future research, including the encapsulation of a model drug, could shed more light on how the working parameters and their interactions could impact the release properties of lipid nanoparticles. On the other hand, studies that include nonlinear relationships in the description of PDI are also needed, as previously mentioned.

4. Conclusions

In this study, dialysis was identified as a critical parameter in microfluidic mixing during the process of manufacturing lipid nanoparticles. The influence of dialysis on the particle size distribution and zeta potential is stronger than the influence of the flow rate ratio. In contrast to the traditional approach centered on total flow and flow rate ratio as the key critical process parameters, our results suggest that the effect of FRR in PSD seems to be nearly negligible when the dialysis process is performed.

Any knowledge gained from the design of space explorations without dialysis might become irrelevant after performing dialysis as an additional step. Consequently, dialysis or any other purification method should be considered as an integrated part of microfluidic manufacturing. Its integration with the process and interactions with other variables should be evaluated from the early stages of pharmaceutical development by Quality by Design.

A broader design of space explorations would lead to a greater understanding of microfluidic mixing manufacturing of lipid nanoparticles. The time and cost of lipid nanoparticle developments should be reduced as a consequence of knowledge growth based on more variables and more levels of interaction, increasing the clinical translation of lipid nanoparticle developments.

Funding

This work was supported by the University of Costa Rica [OAICE-64-2019]; Spanish Ministry of Science and Innovation grant PID2020-118859GB-I00; and the Andalusian Government grants P20_01269 and P20_01271.

Institutional review board statement

Not applicable.

Informed consent statement

Not applicable.

CRediT authorship contribution statement

Ronny Vargas: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Miquel Romero:** Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Tomás Berasategui:** Investigation. **David A. Narváez-Narváez:** Investigation. **Patricia Ramirez:** Methodology, Formal analysis. **Anna Nardi-Ricart:** Funding acquisition, Resources. **Encarna García-Montoya:** Funding acquisition, Resources. **Pilar Pérez-Lozano:** Funding acquisition, Resources. **Josep M^a Suñe-Negre:** Funding acquisition, Resources. **Cristina Moreno-Castro:** Funding acquisition, Resources. **Cristina Hernández-Munain:** Funding acquisition, Resources. **Carlos Suñe:** Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition, Project administration. **Marc Suñe-Pou:** Visualization, Writing – review & editing, Supervision, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

The data supporting the conclusions of this study are available in the article. Raw data is available upon request.

Acknowledgments

We would like to thank Dra. Maria Antonia Busquets and Dra. Josefa Badia and their respective laboratory teams for their assistance in providing the resources and equipment for some of the analytical procedures required for this research, and Inside Therapeutics (France) for the technical support with the setting up of the microfluidic set for nanoparticle preparation. The authors would like to acknowledge Lic. Pablo Vargas Monge for his contribution with the elaboration of the graphical abstract.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2023.100709>.

References

- [1] Y. Li, Z. Ye, H. Yang, Q. Xu, Tailoring combinatorial lipid nanoparticles for intracellular delivery of nucleic acids, proteins, and drugs, *Acta Pharm. Sin. B* 12 (2022) 2624–2639, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.04.013>.
- [2] S. Sheoran, S. Arora, R. Samsonraj, P. Govindaiah, Vuree, S., Lipid-based nanoparticles for treatment of cancer, *Heliyon* 8 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.E09403> e09403.
- [3] T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 36–48, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>.
- [4] N.M. Belliveau, J. Huft, P.J. Lin, S. Chen, A.K. Leung, T.J. Leaver, A.W. Wild, J. B. Lee, R.J. Taylor, Y.K. Tam, et al., Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA, *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 1 (2012), e37, <https://doi.org/10.1038/mtna.2012.28>.
- [5] M.J.W. Evers, J.A. Kulkarni, R. van der Meel, P.R. Cullis, P. Vader, R.M. Schiffelers, State-of-the-art design and rapid-mixing production techniques of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery, *Small Methods* 2 (2018) 1700375, <https://doi.org/10.1002/smt.201700375>.
- [6] M. Maeki, N. Kimura, Y. Sato, H. Harashima, M. Tokeshi, Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 128 (2018) 84–100, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.008>.
- [7] S. Colombo, M. Beck-Broichsitter, J.P. Bøtker, M. Malmsten, J. Rantanen, A. Bohr, Transforming nanomedicine manufacturing toward quality by design and microfluidics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 128 (2018) 115–131, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.004>.
- [8] Y. Bao, Q. Deng, Y. Li, S. Zhou, Engineering docetaxel-loaded micelles for non-small cell lung Cancer: a comparative study of microfluidic and bulk nanoparticle preparation, *RSC Adv.* 8 (2018) 31950–31966, <https://doi.org/10.1039/C8RA04512G>.
- [9] N. Kimura, M. Maeki, Y. Sato, A. Ishida, H. Tani, H. Harashima, M. Tokeshi, Development of a microfluidic-based post-treatment process for size-controlled lipid nanoparticles and application to siRNA delivery, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12 (2020) 34011–34020, <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.0C05489>.
- [10] S. Streck, A.J. Clulow, H.M. Nielsen, T. Rades, B.J. Boyd, A. McDowell, The distribution of cell-penetrating peptides on polymeric nanoparticles prepared using microfluidics and elucidated with small angle X-ray scattering, *J. Colloid Interface Sci.* 555 (2019) 438–448, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.08.007>.
- [11] M.S. Ali, N. Hooshmand, M. El-Sayed, H.I. Labouta, Microfluidics for development of lipid nanoparticles: paving the way for nucleic acids to the clinic, *ACS Appl. Bio Mater.* 13 (2021) 8, <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00732>.
- [12] T.A. Balbino, N.T. Aoki, A.A.M. Gasperini, C.L.P. Oliveira, A.R. Azzoni, L. P. Cavalcanti, L.G. de la Torre, Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications, *Chem. Eng. J.* 226 (2013) 423–433, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.053>.
- [13] L. You, J. Wang, T. Liu, Y. Zhang, X. Han, T. Wang, S. Guo, T. Dong, J. Xu, G. J. Anderson, et al., Targeted brain delivery of rabies virus glycoprotein 29-modified deferamine-loaded nanoparticles reverses functional deficits in parkinsonian

- mice, *ACS Nano* 12 (2018) 4123–4139, <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08172>.
- [14] K. Bhise, S.K. Kashaw, S. Sau, A.K. Iyer, Nanostructured lipid carriers employing polyphenols as promising anticancer agents: quality by design (QbD) approach, *Int. J. Pharm.* 526 (2017) 506–515, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.078>.
- [15] J. Akbari, M. Saeedi, F. Ahmadi, S. Mohammad, H. Hashemi, A. Babaei, S. Yaddollahi, S. Rostamkalei, K. Asare-Addo, A. Nokhodchi, et al., Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: A Review of the Methods of Manufacture and Routes of Administration, 2022, pp. 1–53, <https://doi.org/10.1080/10837450.2022.2084554>.
- [16] T. Terada, J.A. Kulkarni, A. Huynh, S. Chen, R. Van Der Meel, Y.C. Yi Tam, P. R. Cullis, Y.Y.C. Tam, P.R. Cullis, Characterization of lipid nanoparticles containing Ionizable cationic lipids using design-of-experiments approach, *Langmuir* 37 (2021) 1120–1128, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c03039>.
- [17] H.H. Ly, S. Daniel, S.K.V. Soriano, Z. Kis, A.K. Blakney, Optimization of lipid nanoparticles for SaRNA expression and cellular activation using a design-of-experiment approach, *Mol. Pharm.* 19 (2022) 1892–1905, <https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.2C00032>.
- [18] C. Fu, Y. Xiang, X. Li, A. Fu, Targeted transport of Nanocarriers into brain for Theranosis with rabies virus glycoprotein-derived peptide, *Mater. Sci. Eng. C* 87 (2018) 155–166.
- [19] G. Yenduri, A.P. Costa, X. Xu, D.J. Burgess, Impact of critical process parameters and critical material attributes on the critical quality attributes of liposomal formulations prepared using continuous processing, *Int. J. Pharm.* 619 (2022), 121700, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121700>.
- [20] M. Suné-Pou, M.J. Limeres, I. Nofrerias, A. Nardi-Ricart, S. Prieto-Sánchez, Y. El-Yousfi, P. Pérez-Lozano, E. García-Montoya, M. Miñarro-Carmona, J.R. Tico, 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 (2019) 159–167, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.037>.
- [21] M. Rawal, A. Singh, M.M. Amiji, Quality-by-design concepts to improve nanotechnology-based drug development, *Pharm. Res.* 36 (2019) 1–20, <https://doi.org/10.1007/S11095-019-2692-6>.
- [22] R. Peraman, K. Bhadrara, Y. Padmanabha Reddy, Analytical quality by design: a tool for regulatory flexibility and robust analytics, *Int. J. Anal. Chem.* 2015 (2015), <https://doi.org/10.1155/2015/868727>.
- [23] D.M. Zagalo, J. Sousa, S. Simões, Quality by design (QbD) approach in marketing authorization procedures of non-biological complex drugs: a critical evaluation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 178 (2022) 1–24, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.07.014>.
- [24] H.B. Grangeia, C. Silva, S.P. Simões, M.S. Reis, Quality by Design in Pharmaceutical Manufacturing: a systematic review of current status, challenges and future perspectives, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 147 (2020) 19–37, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.12.007>.
- [25] S.N. Politis, P. Colombo, G. Colombo, D.M. Rekkas, Design of Experiments (DoE) in Pharmaceutical Development 43, 2017, pp. 889–901, <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672>.
- [26] M.S. Taha, S. Padmakumar, A. Singh, M.M. Amiji, Critical quality attributes in the development of therapeutic nanomedicines toward clinical translation, *Drug Deliv. Transl. Res.* 10 (2020) 766–790, <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00744-1>.
- [27] Y. Fan, M. Marioli, K. Zhang, Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 192 (2021), 113642, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>.
- [28] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanazadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of Lipidic Nanocarrier systems, *Pharmaceutics* 10 (2018) 1–17, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- [29] J. Li, Y. Qiao, Z. Wu, Nanosystem trends in drug delivery using quality-by-design concept, *J. Control. Release* 256 (2017) 9–18, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.019>.
- [30] S. Beg, M. Rahman, K. Kohli, Quality-by-design approach as a systematic tool for the development of Nanopharmaceutical products, *Drug Discov. Today* 24 (2019) 717–725, <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2018.12.002>.
- [31] V. Agrahari, V. Agrahari, Facilitating the translation of nanomedicines to a clinical product: challenges and opportunities, *Drug Discov. Today* 23 (2018) 974–991, <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2018.01.047>.
- [32] R. Lball, P. Bajaj, K.A. Whitehead, Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of PH, temperature, and lyophilization, *Int. J. Nanomedicine* 12 (2017) 305, <https://doi.org/10.2147/IJN.S123062>.
- [33] K. Okuda, Y. Sato, K. Iwakawa, K. Sasaki, N. Okabe, M. Maeki, M. Tokeshi, H. Harashima, On the size-regulation of RNA-loaded lipid nanoparticles synthesized by microfluidic device, *J. Control. Release* 348 (2022) 648–659, <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.06.017>.
- [34] M. Hibino, Y. Yamada, N. Fujishita, Y. Sato, M. Maeki, M. Tokeshi, H. Harashima, The use of a microfluidic device to encapsulate a poorly water-soluble drug CoQ10 in lipid nanoparticles and an attempt to regulate intracellular trafficking to reach mitochondria, *J. Pharm. Sci.* 108 (2019) 2668–2676, <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2019.04.001>.
- [35] J.A. Kulkarni, D. Witzigmann, J. Leung, R. Van Der Meel, J. Zaifman, M. M. Darjuan, H.M. Grisch-Chan, B. Thöny, Y.Y.C. Tam, P.R. Cullis, Fusion-dependent formation of lipid nanoparticles containing macromolecular payloads, *Nanoscale* 11 (2019) 9023–9031, <https://doi.org/10.1039/C9NR02004G>.
- [36] C.B. Roces, G. Lou, N. Jain, S. Abraham, A. Thomas, G.W. Halbert, Y. Perrie, Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics, *Pharm.* 12 (2020) 1095, <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12111095>.
- [37] M. Tiboni, M. Tiboni, A. Pierro, M. Del Papa, S. Sparaventi, M. Cespi, L. Casettari, Microfluidics for nanomedicines manufacturing: an affordable and low-cost 3D printing approach, *Int. J. Pharm.* 599 (2021), 120464, <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120464>.
- [38] J. Riewe, P. Erfle, S. Melzig, A. Kwade, A. Dietzel, H. Bunjes, Antisolvent precipitation of lipid nanoparticles in microfluidic systems – a comparative study, *Int. J. Pharm.* 579 (2020), 119167, <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2020.119167>.
- [39] L. Breiman, J.H. Friedman, R.A. Olshen, C.J. Stone, Classification and regression trees, *Classif. Regres. Trees* (1984) 1–358, <https://doi.org/10.1201/9781315139470>.
- [40] A. Giuliani, The application of principal component analysis to drug discovery and biomedical data, *Drug Discov. Today* 22 (2017) 1069–1076, <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2017.01.005>.
- [41] E. Kastner, R. Kaur, D. Lowry, B. Moghaddam, A. Wilkinson, Y. Perrie, High-throughput manufacturing of size-tuned liposomes by a new microfluidics method using enhanced statistical tools for characterization, *Int. J. Pharm.* 477 (2014) 361–368, <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2014.10.030>.
- [42] M. Samari-Kermani, S. Jafari, M. Rahnama, A. Raoof, Ionic strength and zeta potential effects on colloid transport and retention processes, *Colloid Interface Sci. Commun.* 42 (2021), 100389, <https://doi.org/10.1016/J.COLCOM.2021.100389>.
- [43] S.S. Rane, P. Choi, Polydispersity index: how accurately does it measure the breadth of the molecular weight distribution? *Chem. Mater.* 17 (2005) 926, <https://doi.org/10.1021/CM048594I>.
- [44] H. Das, N. Debnath, T. Arai, T. Kawaguchi, N. Sakamoto, K. Shinozaki, H. Suzuki, N. Wakiya, Superparamagnetic magnesium ferrite/silica core-shell nanospheres: a controllable SiO₂ coating process for potential magnetic hyperthermia application, *Adv. Powder Technol.* 30 (2019) 3171–3181, <https://doi.org/10.1016/J.APT.2019.09.026>.
- [45] T. Bastogne, Quality-by-Design of Nanopharmaceuticals – a state of the art, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 13 (2017) 2151–2157, <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2017.05.014>.
- [46] E. Tomba, P. Facco, F. Bezzo, M. Barolo, Latent variable modeling to assist the implementation of quality-by-design paradigms in pharmaceutical development and manufacturing: a review, *Int. J. Pharm.* 457 (2013) 283–297, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.074>.

Anexo 2-2

Vargas R, Romero M, Berasategui T, Narváez-Narváez DA, Ramirez P, Nardi-Ricart A, et al. Dialysis is a key factor modulating interactions between critical process parameters during the microfluidic preparation of lipid nanoparticles. Colloids and Interface Science Communications [Internet]. 2023;54(March). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2023.100709>
[Información suplementaria]

Supplementary Information

Dialysis is a key factor modulating interactions between critical process parameters during the microfluidic preparation of lipid nanoparticles.

Ronny Vargas^{1,2}; Miquel Romero¹; Tomás Berasategui¹; David A Narváez- Narváez¹; Patricia Ramirez³; Anna Nardi-Ricart¹; Encarna García-Montoya^{1,4}; Pilar Pérez-Lozano^{1,4}; Josep M^a Suñe-Negre^{1,4}; Cristina Moreno-Castro⁵; Cristina Hernández-Munain⁵; Carlos Suñe^{5*}; Marc Suñe-Pou^{1,4}.

- 1- Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.
- 2- Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Costa Rica, San José, Costa Rica.
- 3- School of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, University of Costa Rica, San Jose, Costa Rica
- 4- Pharmacotherapy, Pharmacogenetics and Pharmaceutical Technology Research Group Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain.
- 5- Department of Molecular Biology, Institute of Parasitology and Biomedicine “López-Neyra” (IPBLN-CSIC), Granada, Spain.
- 6- Department of Cell Biology and Immunology, Institute of Parasitology and Biomedicine “López-Neyra” (IPBLN-CSIC), Granada, Spain

Correspondence to: Carlos Suñe **E-mail:** csune@ipb.csic.es

Marc Suñe **E-mail:** marcsune@ub.edu

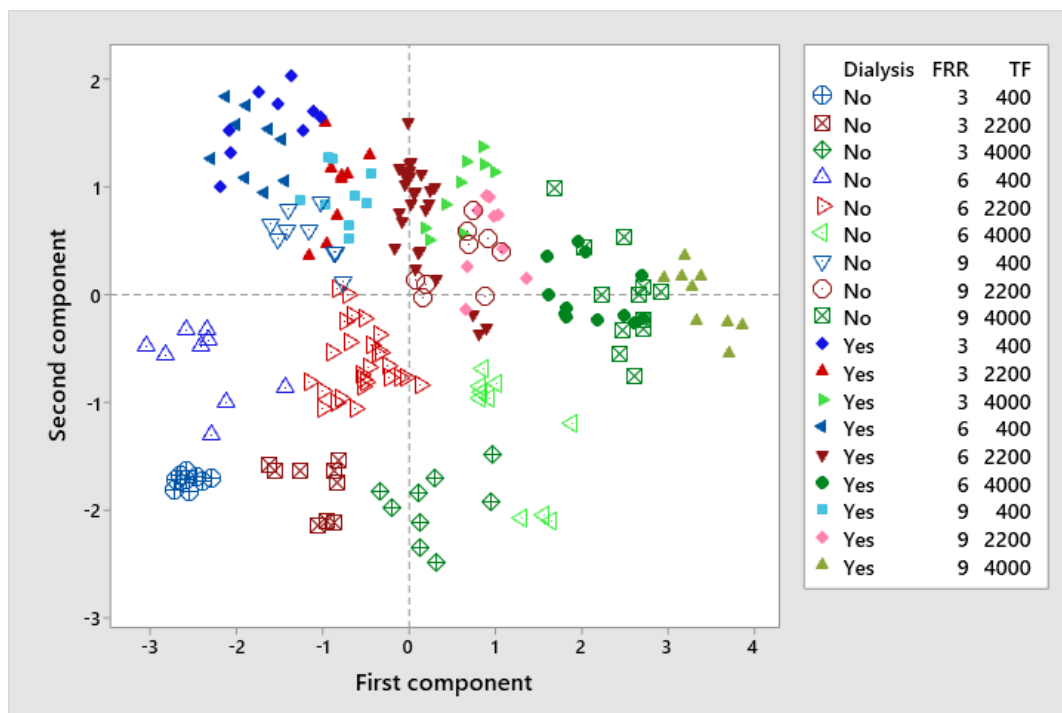


Figure S1. Score plot from the principal components analysis. Principal component analysis allows the data variance to be visualized and explained. Each symbol represents a different level of factor combination (see legend for details). The clustering of symbols by each of the three factors supports the multiple regression conclusions, indicating that there is a correlation between the factors (variables) and the observations (71% of variance explained in two components). TF= total flow; FRR= flow rate ratio.

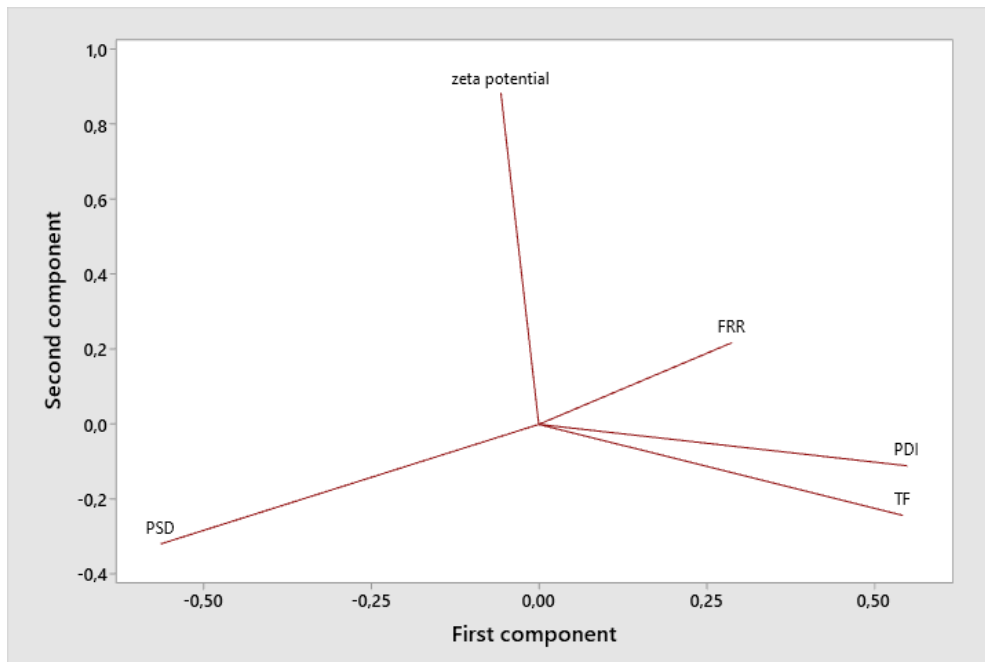


Figure S2. Loading plot from the principal component analysis. Through the loading, the variable that exhibits a stronger influence on each component can be identified by comparing the length of the corresponding line. In addition, the plot allows us to determine if the relationship between variables and observations is directly or indirectly proportional by comparing whether variable and observation lines are opposite (indirectly) or point in the same direction (directly). Thus, this plot supports the multiple regression conclusions on TF and FRR relative relevance, and it is another illustration that lower PSD and higher PDI values are expected at higher TF and FRR values. TF= total flow; FRR= flow rate ratio; PSD= particle size distribution; PDI= polydispersity index.

Table S1. Analysis of variance from the regression model. For particle size, polydispersity index and zeta potential¹.

Factors	Particle size distribution		Zeta Potential		Polydispersity Index	
	Adjusted mean squares	p-value ²	Adjusted mean squares	p-value	Adjusted mean squares.	p-value
Total flow (TF)	117562	0.000	966.4	0.000	50.048	0.000
Flow rate ratio (FRR)	25978	0.000	11.1	0.411	21.1975	0.000
Dialysis (D)	44056	0.000	10212.1	0.000	4.639	0.002
TF*TF	0.006	0.848	14.4	0.350	1.8022	0.058
FRR*FRR	0.406	0.106	55.5	0.067	3.366	0.010³
TF*FRR	4.896	0.000	44.3	0.102	7.879	0.000
TF*D	0.885	0.017	53.5	0.073	2.246	0.034
FRR*D	11.087	0.000	4272.2	0.000	3.3189	0.010 ³

Notes: 1- Before the regression model, the data normality were evaluated and transformed (if necessary) following the approach and verifications detailed in Figures S5, S6 and S7, and in Table S2. 2- Bold highlighted values correspond to statistically significant differences between means (p-value<0.01). 3- The determination of statistical significance of FRR*FRR and FRR*D for PDI (p=0,010) was made in joint observation of the value of the standardized effects on Figure 4E.

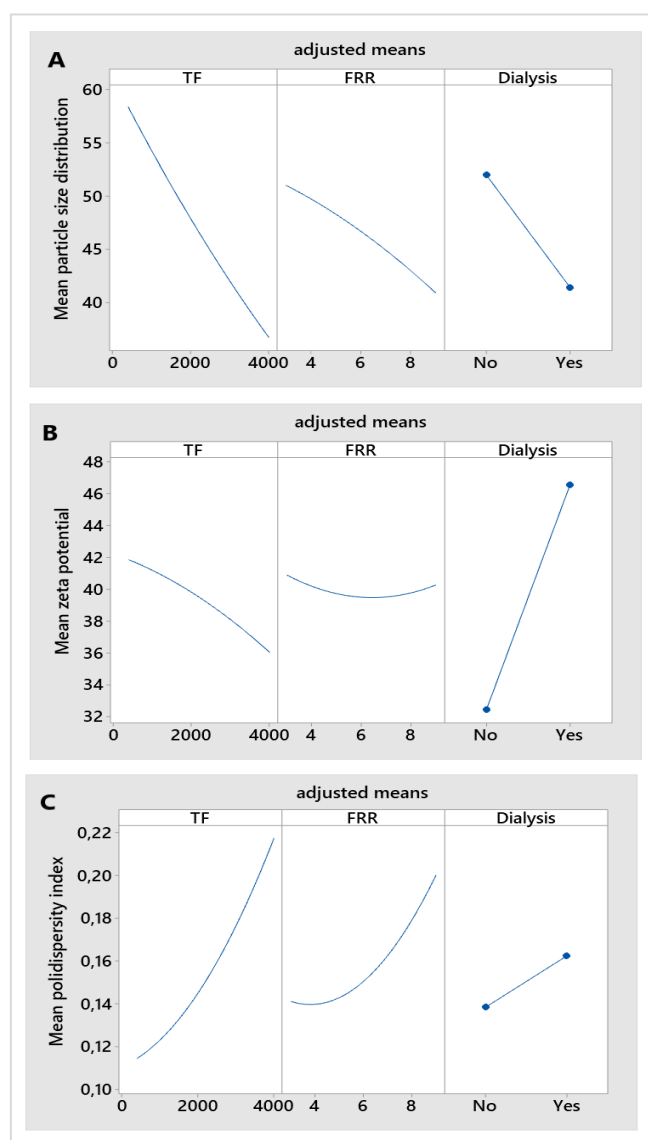


Figure S3. Main effects plot from the particle size distribution (PSD), zeta potential and polydispersity index (PDI).

A) The main effects for PSD show a decrease in size as total flow (TF) and flow rate ratio (FRR) increase, which was also observed for dialyzed samples. B) Main effects of the zeta potential, which decreases with high TF values and undialyzed samples. The curvature for the mean effect of FRR results from the averaged effect with and without dialysis, but each FRR line in Figure 4D-iii corresponds to a straight line with a defined direction (opposite effects with and without dialysis). C) Main effects for PDI. The effect of FRR suggests a nonlinear relationship for PDI, as well as the relatively low R² value (0.50).

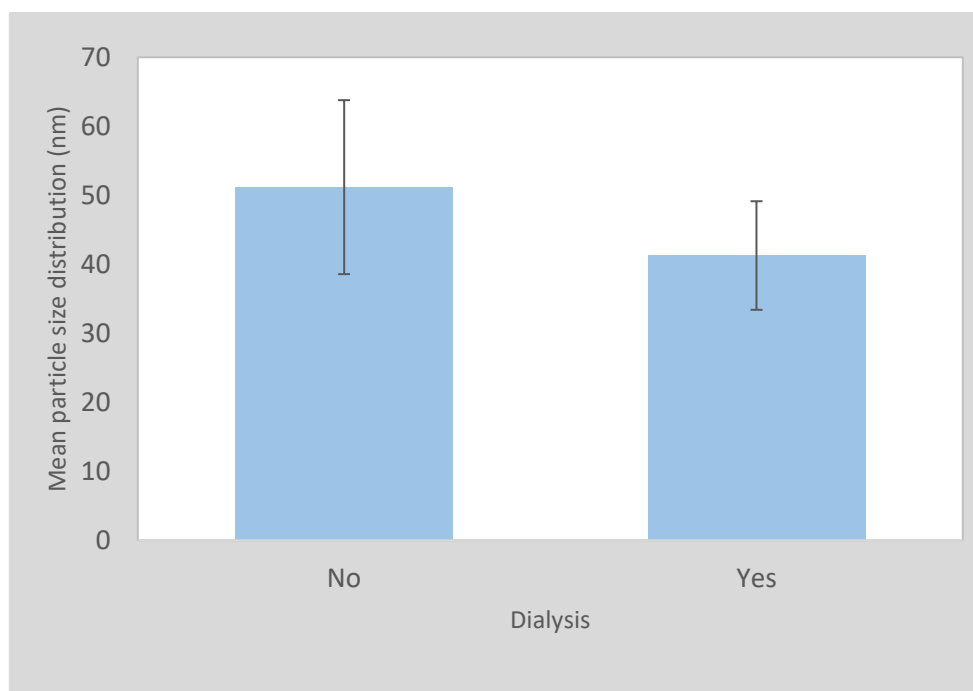


Figure S4. Particle size distributions by dialysis. Dialyzed samples showed a lower mean PSD and less data dispersion than that of unpurified samples.

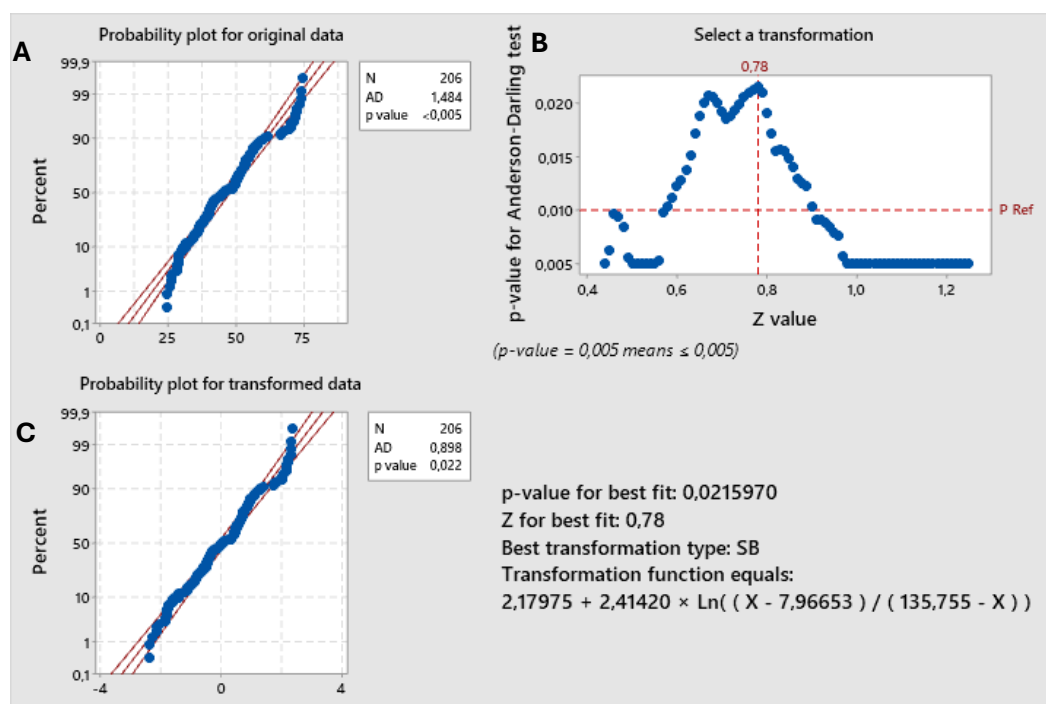


Figure S5. Normality test and data transformation of particle size distribution. A) Raw data for particle size deviate from a normal distribution, thus a transformation is required for better fit. B) Transformation data were obtained following the MINITAB® Johnson transformation function, and the transformed data were stored for subsequent regression analysis. An alpha of 0.01 was used to evaluate the distribution fit. C) Transformed data adjusted to a normal distribution with a p value of 0.022. In addition, the conclusions from the regression model were contrasted with a Kruskal-Wallis nonparametric analysis of the original data (Table S2).

Table S2. Kruskal-Wallis test for PSD. The nonparametrical Kruskal-Wallis test was performed on the original PSD data due to the deviation from the ideal distribution and the relatively low p-value for best fit of the transformed PSD data (compared to the p-value for the normal distribution on zeta potential and the transformed PDI). The results from the Kruskal-Wallis analysis were consistent with the conclusions of the regression model shown in Table S1 and figure 4A, thus extending the statistical support to the discussed observations for PSD.

	Degrees of freedom	H statistic	P value
Total Flow	2	104,73	0,000
Flor rate ratio	2	17,18	0,000
Dialysis	1	36,05	0,000

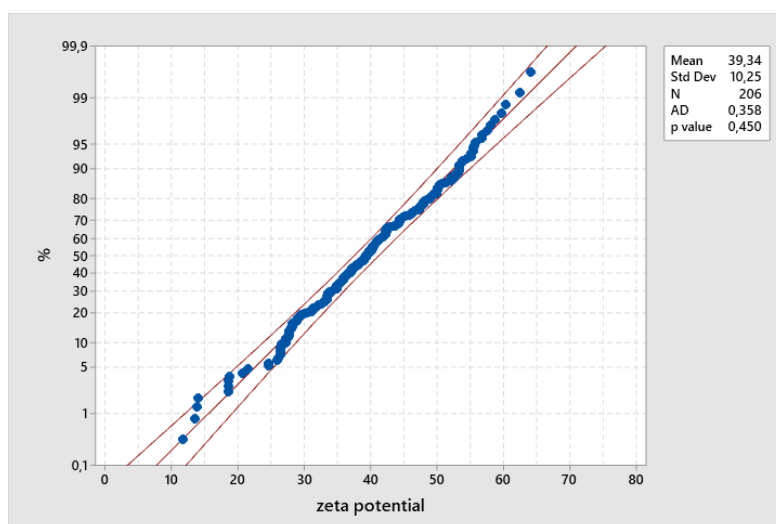


Figure S6. Probability plot for the zeta potential. The zeta potential data were normally distributed before regression analysis was performed.

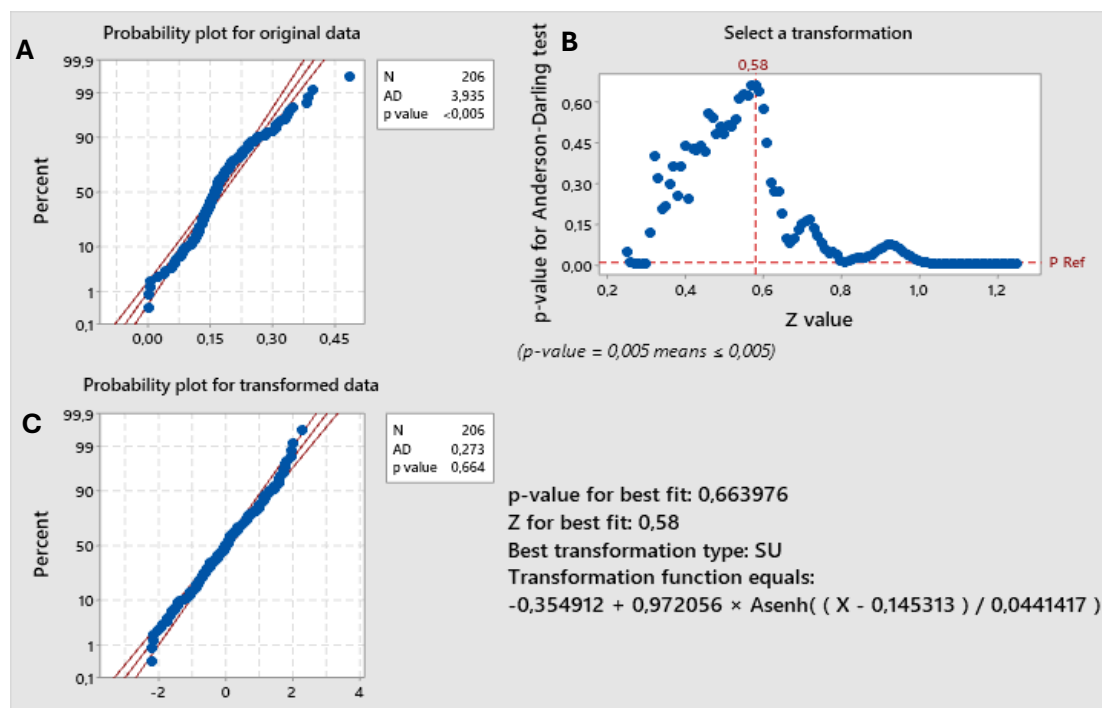


Figure S7. Normality test and data transformation of PDI data. A) Raw data for the polydispersity index deviate from a normal distribution: thus, transformation is needed for better fit. B) Transformation data were obtained following the MINITAB® Johnson transformation function, and the transformed data were stored for subsequent regression analysis. An alpha of 0.01 were used to evaluate the distribution fit. C) Transformed data were adjusted to a normal distribution with a p value of 0.664.

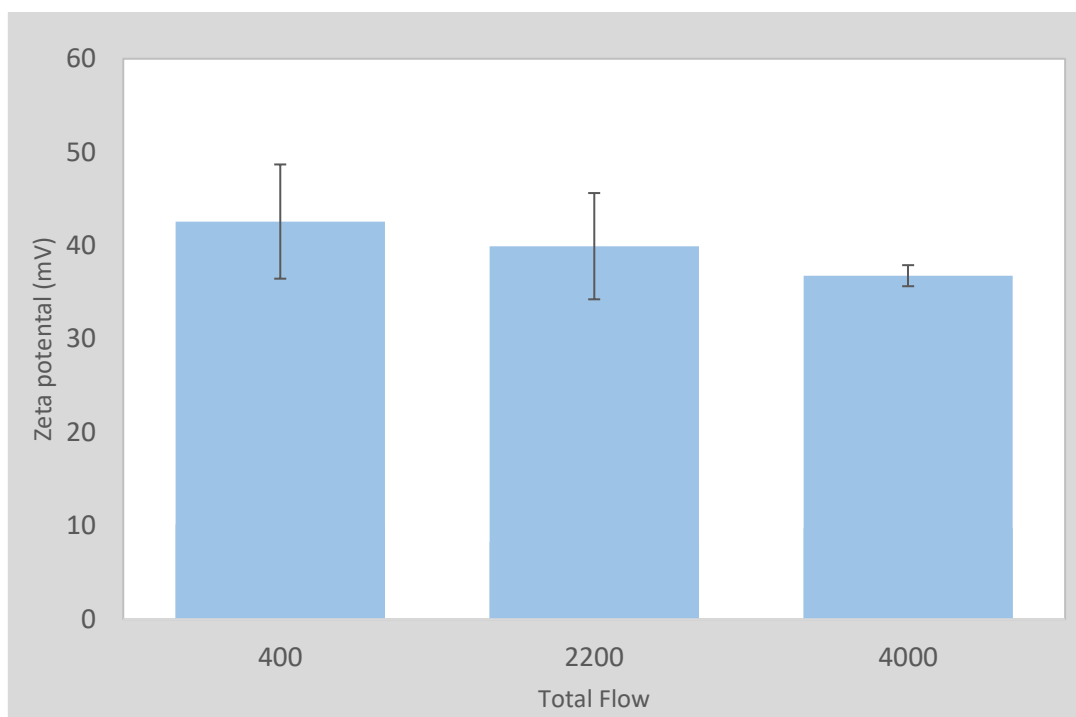


Figure S8. Zeta potential of lipid nanoparticles by total flow (TF). Zeta potential values tend to decrease as TF increases. This contribution was statistically significant ($p=0.000$). Samples at 4000 mL min⁻¹ showed less data dispersion.

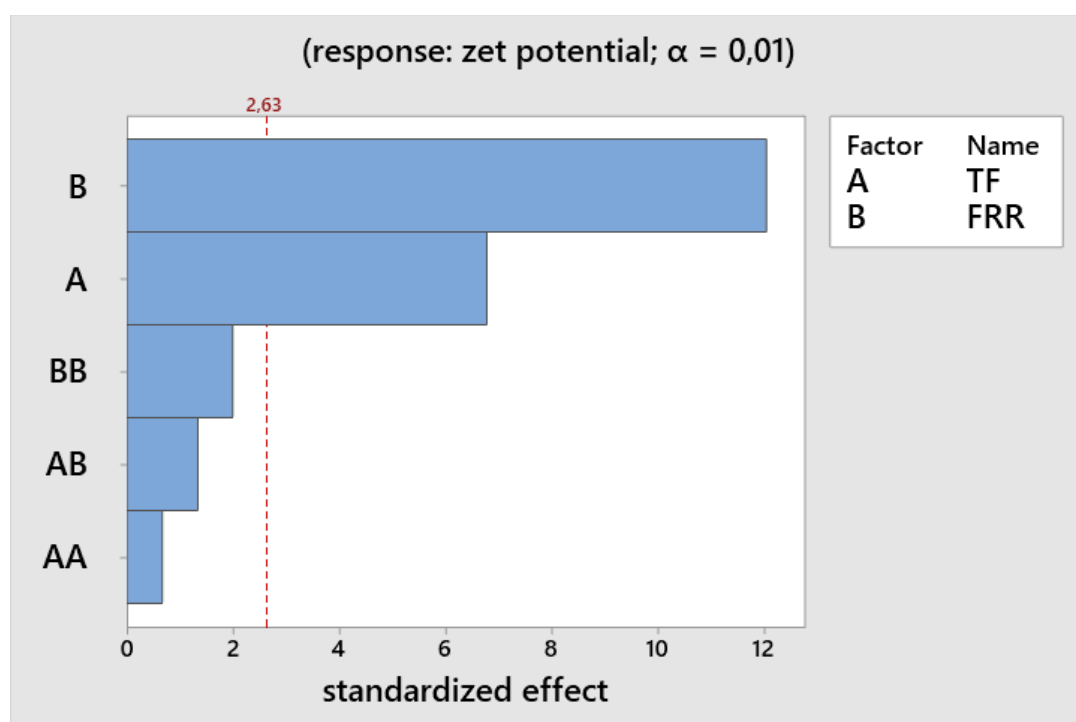


Figure S9. Pareto plot for TF and FRR standardized effects on zeta potential with only dialyzed data. The relevance of factors when dialysis is set as a mandatory process is shown. Without the average effect of the unpurified data (illustrated in Figure 4D-iii), FRR exhibits a statistically significant effect, as did TF ($p=0.000$ for both, $R^2=0.67$). The regression equation is $\text{zeta potential} = 68.24 - 0.00175 \text{ TF} - 3.98 \text{ FRR} + 0.000000 \text{ TF} \cdot \text{TF} + 0.1801 \text{ FRR} \cdot \text{FRR} - 0.000165 \text{ TF} \cdot \text{FRR}$. For the unpurified data, FRR also shows a significant effect, with similar magnitude but with an opposite direction.

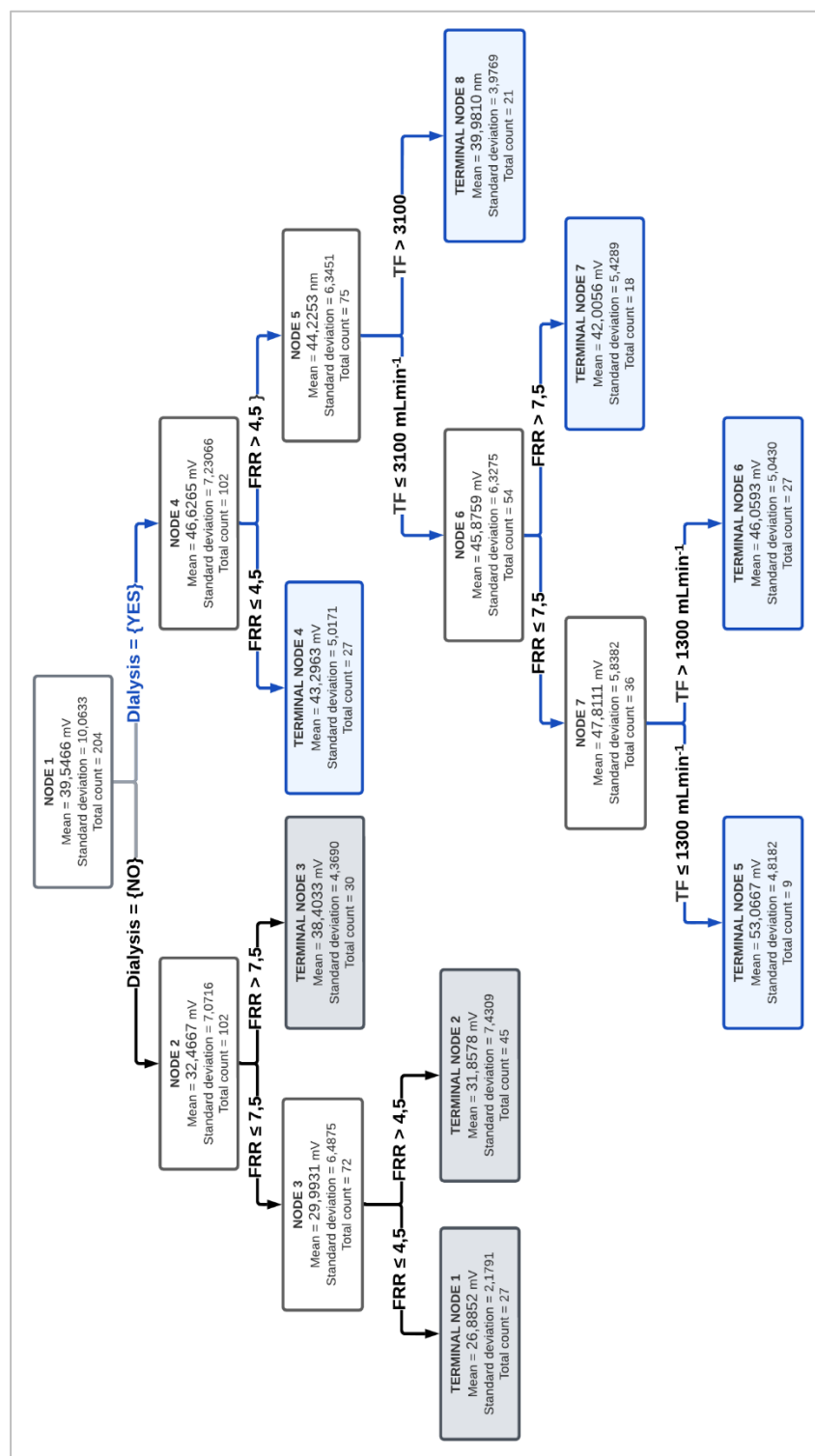


Figure S10. Classification and regression tree for zeta potential. The effects of dialysis, flow rate ratio (FRR) and total flow (TF) (in descending order of contribution) are shown. The asymmetry of the two main branches (after dialysis split) suggests the presence of interactions, which become more complex with the application of the purification process. The TF influence is seen on the subbranches derived from node 5. Contrary to what could be concluded from the isolated observation of Figure 4C and Table S1***, the FRR is a significant factor on zeta potential, which is also supported by a deeper analysis of Figure 4D and S-9.

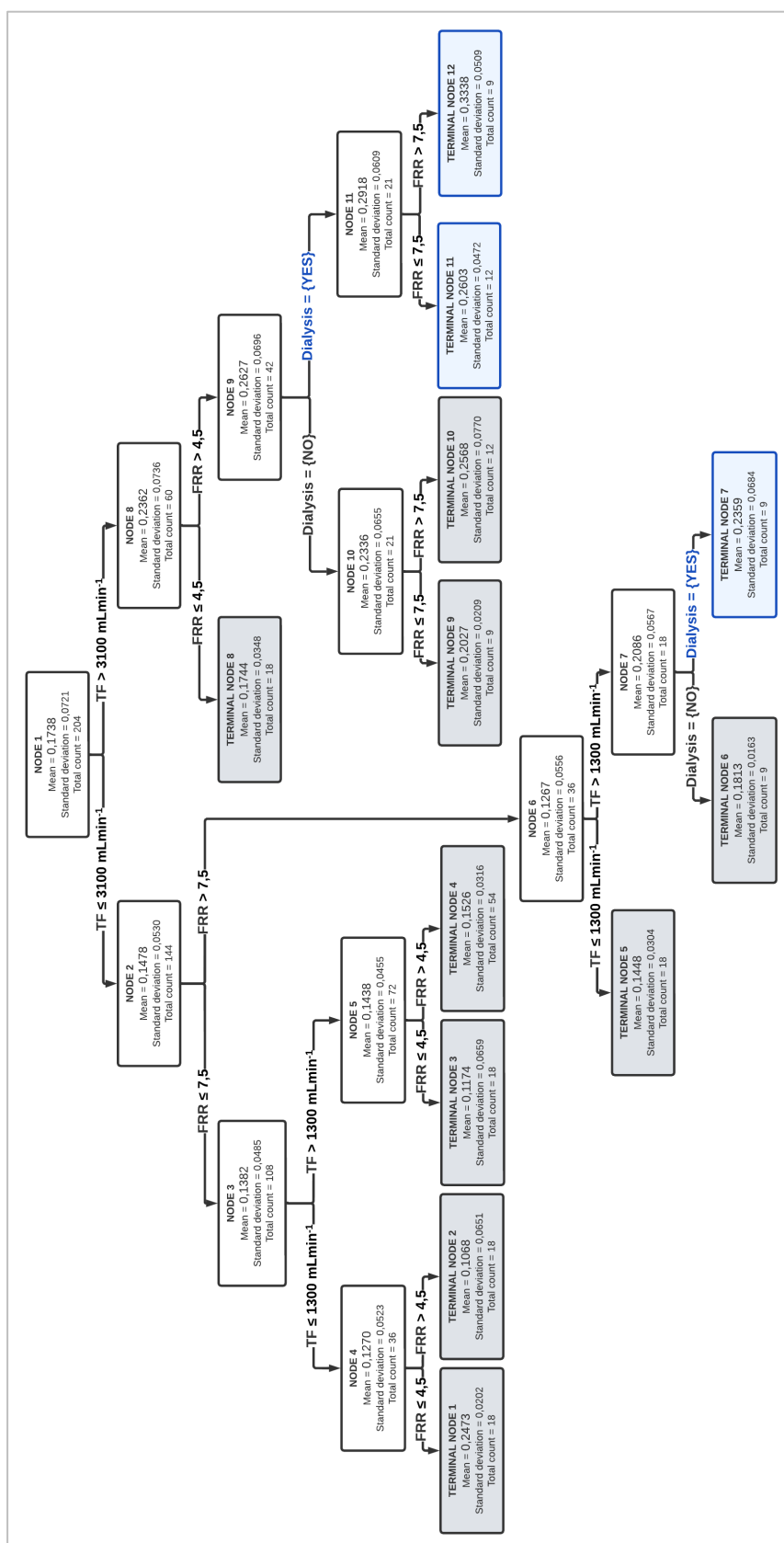
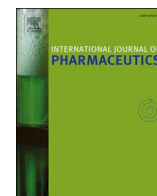


Figure S11. Classification and regression tree for polydispersity index (PDI). The effects of flow rate ratio (FRR), total flow (TF) and dialysis (in descending order of contribution) are shown. Each of the branches has a different pattern of factor interaction, For example, the general effect is to increase PDI as higher levels of FRR, except for the split before node 4. This asymmetry is an illustration of the complexity of PDI at this level of linear evaluation. Light blue boxes (the dialyzed terminal nodes: nodes 7, 11 and 12) show higher PDI values than those of the gray boxes (unpurified terminal nodes).

Anexo 2-3

Vargas R, Lizano-Barrantes C, Romero M, Valencia-Clua K, Narváez-Narváez DA, Suñé-Negre JM, et al. The piper at the gates of brain: A systematic review of surface modification strategies on lipid nanoparticles to overcome the Blood-Brain-Barrier. *Int J Pharm* [Internet]. 2024 Sep 13 [cited 2024 Sep 18]; 665(124686). Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517324009207>
[Cuerpo principal del artículo]



The piper at the gates of brain: A systematic review of surface modification strategies on lipid nanoparticles to overcome the Blood-Brain-Barrier

Ronny Vargas^{a,b,**}, Catalina Lizano-Barrantes^c, Miquel Romero^a, Kevin Valencia-Clua^a, David A. Narváez-Narváez^a, Josep M^a Suñé-Negre^{a,d}, Pilar Pérez-Lozano^{a,d}, Encarna García-Montoya^{a,d}, Noelia Martínez-Martínez^e, Cristina Hernández-Munain^f, Carlos Suñé^{e,*}, Marc Suñé-Pou^{a,d}

^a Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

^c Department of Pharmaceutical Care and Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

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

^e Department of Molecular Biology, Institute of Parasitology and Biomedicine "López-Neyra" (IPBLN-CSIC), Granada, Spain

^f Department of Cell Biology and Immunology, Institute of Parasitology and Biomedicine "López-Neyra" (IPBLN-CSIC), Granada, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Active targeting
Brain delivery
Nanoparticle decoration
Nanoparticle functionalization
Functionalization strategies
Receptor targeting
Ligand selection

ABSTRACT

The Blood-Brain Barrier (BBB) significantly impedes drug delivery to the central nervous system. Nanotechnology, especially surface-functionalized lipid nanoparticles, offers innovative approaches to overcome this barrier. However, choosing an effective functionalization strategy is challenging due to the lack of detailed comparative analysis in current literature. Our systematic review examined various functionalization strategies and their impact on BBB permeability from 2041 identified articles, of which 80 were included for data extraction. Peptides were the most common modification (18) followed by mixed strategies (12) proteins (9), antibodies (7), and other strategies (8). Interestingly, 26 studies showed BBB penetration with unmodified or modified nanoparticles using commonly applied strategies such as PEGylation or surfactant addition. Statistical analysis across 42 studies showed correlation between higher *in vivo* permeation improvements and nanoparticle type, size, and functionalization category. The highest ratios were found for nanostructured lipid carriers or biomimetic systems, in studies with particle sizes under 150 nm, and in those applying mixed functionalization strategies. The interstudy heterogeneity we observed highlights the importance of adopting standardized evaluation protocols to enhance comparability. Our systematic review aims to provide a comparative insight and

Abbreviations: 8314 Mab, 83-14 monoclonal antibody; Ab, Antibodies; AEGFR, Anti-epithelial growth factor receptor; API, Active pharmaceutical ingredient (API); ApoE, ApolipoproteinE.; Apr, Anti-aprotinin; AUC, Area Under the curve; BBB, Blood-brain barrier; Bend.3, Brain endothelial cells derived from mice; BMECs, Brain microvascular endothelial cells; CART, Classification and regression tree; CCR5, RNA aptamer specific for the HIV-1 entry coreceptor C-C chemokine receptor type 5; Cntn2, Contactin-2; CNS, Central nervous system; CURC, Curcumin; DHA, Docosahexaenoic acid; DHDP, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, dihexadecyl phosphate; DPPC, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; Dox, Doxorubicin; DSI, Drug selectivity index; DSPE, 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; DTI, Drug Targeting Index; DTX, Docetaxel; ECs, Brain microvascular endothelial cells.; EGCG, Epigallocatechin gallate; ETP, Etosiposide; GAHBA, S-(−)-γ-amino-α-hydroxybutyric acid; GP160, RNA aptamer specific for the HIV-1 envelope protein; HA, Human astrocytes; HBVP, Human brain vascular pericytes; hCMEC/D3, Human cerebral endothelial cells; HLB, hydrophilic lipophilic balance; hiPSC, Induced pluripotent stem cell; HIV, Human immunodeficiency virus; IVIVC, *in vivo* *in vitro* correlation; LAT1, Large amino acid transporter 1; LDLR, low density lipoprotein receptor; Lf, Lactoferrin; LNPs, Lipid nanoparticles; MA, Anti-Melanotransferrin; MAN, Mannose; ME, Methylprednisolone; mRNA, Messenger ribonucleic acid; Nfasc, Neurofascin; NMD, Nimodipine; NGF, nerve growth factor; NLCs, Nanostructured lipid carriers; NPs, Nanoparticles; OoC, Organ-On-a-Chip systems; PAMPA, parallel artificial membrane permeability assay; Pen, Penetratin; PRISMA, Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses; PCA, Principal Component Analysis; PGP, N-Acetyl-Pro-Gly-Pro; QbD, Quality by Design; QU, Quercetin; RDP, Rabies virus derived peptide; ROA, Rosmarinic acid; RVG, rabies virus glycoprotein; siRNA, small interfering ribonucleic acid; SLNs, Solid lipid nanoparticles; TA, Tamoxifen; T1/2, half life in plasma; Tf, Transferin targeting peptide; TJ, Tight junctions; Tmax, time to peak measurement; TPGS, D-α-Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate; TPP, Triphenylphosphine cation; VGF, nerve growth factor.; WGA, Wheat germ agglutinin.

* Corresponding author.

** Corresponding author at: Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

E-mail addresses: ronny.vargas_m@ucr.ac.cr (R. Vargas), csune@ipb.csic.es (C. Suñé).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124686>

Received 22 May 2024; Received in revised form 2 September 2024; Accepted 7 September 2024

Available online 13 September 2024

0378-5173/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

identify future research directions in the development of more effective lipid nanoparticle systems for drug delivery to the brain to help improve the treatment of neurological and psychiatric disorders and brain tumours.

1. Introduction

The delivery of therapeutic agents into the central nervous system (CNS) remains one of the major challenges in neuropharmacology, primarily due to the Blood-Brain Barrier (BBB) (Wu et al., 2023; Guillauma Barroso et al., 2020; Tosi et al., 2019; Ding et al., 2020). Its limited permeability is essential for maintaining homeostasis, both by excluding toxins and pathogens (Akhtar et al., 2021; Bors and Erdö, 2019) and by allowing the transport of nutrients and oxygen (Wanat, 2020). However, the same permeability characteristics significantly impedes the development of treatments by excluding over 98 % of small molecule drugs and almost all large-molecule biopharmaceuticals (Pandit et al., 2020).

The BBB separates the CNS from the bloodstream and owes its permeability selectiveness to its unique vascular structure. This structure is composed of multiple cell types that together form the neurovascular unit (Wanat, 2020; Figueroa et al., 2022). The primary components of the BBB are brain microvascular endothelial cells (ECs), which differ in function and morphology from endothelial cells in other vascular systems. These cells are characterized by an absence of fenestrations which reduces surface area, and a negative surface charge due to luminal/abluminal polarization which repels polar substances (Wanat, 2020; Alahmari, 2021; Zhao et al., 2022). Moreover, they show restricted pinocytosis activity (Tosi et al., 2019; Ding et al., 2020) and yet exhibit a higher metabolic rate than other endothelial cells. This high metabolic activity is essential for the protein-mediated selective inflow of nutrients, and the outflow of specific substrates or foreign substances (Wu et al., 2023; Bors and Erdö, 2019). ECs in the BBB are closely connected due to the presence of tight junctions (TJ) and adherence junction proteins, restringing the paracellular passage of substances (Wanat, 2020; Pandit et al., 2020). Additionally, astrocytes and pericytes are two cell types surrounding the blood vessels, acting as an interface between neurons and ECs. These cell types play crucial roles in the maturation and maintenance of the BBB. For instance, astrocytes and pericytes are essential to the expression of TJ proteins and regulate the expression and localization of specific transport mechanisms across the BBB (Alahmari, 2021; Zhao et al., 2022). Astrocytes and pericytes also play a key role in regulating blood flow and vascular function, thereby modulating neuroimmune responses and waste elimination (Wu et al., 2023).

The neurovascular unit is complemented by non-cellular components such as the basement membrane and scaffolding proteins. These elements are crucial for the transporter polarization observed in the BBB and to ensure cellular stability (Pandit et al., 2020; Zhao et al., 2022). Compounds that cross the BBB must face an additional line of defense: chemical decomposition by the enzymatic activity of degrading enzymes (Wu et al., 2023; Guillauma Barroso et al., 2020; Wanat, 2020). Understanding the intricate anatomical composition of the BBB and its impact on its formidable selectiveness –which favours nutrients over foreign substances– is crucial for developing effective drug delivery systems that address the clinical challenges in treating CNS diseases (Mishra et al., 2023).

Several strategies have been proposed for transporting substances across the BBB. In practice, these can be categorized into: i) non-invasive methods (both passive and active targeting) and ii) invasive methods (such as chemical or physical disruption of the BBB, or direct administration into the CNS) (Mishra et al., 2023; Khatoun et al., 2020; Ferraris et al., 2020). However, passive targeting is typically limited to substances with low molecular weight (Nowak et al., 2020), and invasive methods are frequently associated with higher risks and potential severe side effects (Mishra et al., 2023; Upadhyay, 2014), considered as their major drawbacks. Consequently, active targeting has emerged as a

promising and widely adopted strategy for overcoming the BBB. This approach utilizes targeting ligands that specifically bind to molecules exclusively present or overexpressed in the BBB (Teixeira et al., 2023). It enhances brain delivery and drug uptake by taking advantage of the high metabolic demand of the CNS and the intrinsic transports mechanisms involved in the brain's native trafficking dynamics (Mishra et al., 2023; Sánchez-Navarro et al., 2017).

In this context, the use of nanoparticles (NPs), and particularly lipid nanoparticles (LNPs), has significantly increased over the past decade, establishing a powerful strategy to enhance brain delivery of therapeutics (Tosi et al., 2019; Ding et al., 2020; Ferraris et al., 2020; Nowak et al., 2020; Ekhtator et al., 2023; Kadari et al., 2018). This is due not only to their capability for surface modification with targeting ligands but also to some of their other intrinsic properties, such as small size, controlled drug release profiles, extended circulation times, improved drug stability, and enhanced bioavailability (Mishra et al., 2023; Correia et al., 2022; Khare et al., 2023). Compared to other types of nanocarriers, LNPs present higher biocompatibility and greater encapsulation efficiencies (Khare et al., 2023). They also achieve elevated transfection rates due to their remarkable fusogenic properties (Veiga et al., 2023), mostly because of their similarity to natural membranes (Menon et al., 2022). Due to these characteristics, LNPs are allegedly more likely to be taken up by the brain (Neves et al., 2021), even without any functionalization (Arduino et al., 2020). However, some authors argue that this passive strategy is difficult to control (Pucci et al., 2020). Therefore, the potential of active targeting of LNPs emerges as a more promising delivery strategy.

Despite extensive literature and academic production, a significant gap remains between emerging research and the clinical application of active targeting of LNPs. Key challenges include characterizing surface density, streamlining formulation screening, enhancing stability, ensuring scale-up feasibility, among others (Menon et al., 2022; Shan et al., 2022). Specifically, selecting the appropriate ligand is crucial and challenging in the development of actively targeted nanoparticles for circumventing the BBB. This complexity is partly due to the difficulty of comparing studies, which often involve several variables (Zhang et al., 2021). Among the aforementioned scientific literature, numerous available reviews focus on functionalization strategies for overcoming the BBB (e.g., (Mishra et al., 2023; Teixeira et al., 2023; Correia et al., 2022; Khare et al., 2023; Ding et al., 2020; Guyon et al., 2020; Sapsford et al., 2013). Some of the available reviews usually present functionalization alternatives within a broad overview, highlighting the diversity in the field. These valuable works tend to focus on listing and explaining different approaches rather than on a comparative analysis of outcomes or in-depth discussion of study specifics. Consequently, there is an opportunity for an updated, comprehensive analysis that builds upon these foundations. Such kind of comparative analysis could provide insights into which strategies have shown the most promising results within their respective experimental designs, thereby offering an indication of the relative success of each approach.

This review focuses on the innovative surface modification strategies of LNPs aimed at enhancing BBB penetration. These strategies range from small molecules and natural compounds to complex biomolecules like peptides, proteins, and antibodies, including combined approaches. Distinguishing itself from previous works, our review aims to provide a comparative analysis of their effectiveness in enhancing BBB penetration compared to their respective unfunctionalized nanoparticles. By highlighting study characteristics that allow for comparisons of the relative effectiveness of various combinations, we were able to draw direct conclusions. Additionally, we also point out features that, if widely adopted, could enable more precise future comparisons. This

work seeks to critically assess whether the currently available data can determine which functionalization strategy might be a more promising candidate, or if some particular methodological approaches could facilitate such conclusions in the future. Understanding these aspects is crucial for future research and application in drug delivery systems for CNS disorders.

2. Bibliometric study

2.1. Methodology

Our search included the Science Direct and PubMed databases, initially conducted on February 16th, 2022, and last updated on July 31st, 2024. We searched for text word terms including: (“functionalized” or “conjugated” or “modified”) and “lipid nanoparticles” and “blood brain barrier”. We adapted the standards and principles of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines (Page et al., 2021), to suit the specific context of the publications within this review. For our eligibility criteria, we included research articles published after 2016 that contained a strategy for evaluating nanoparticles, either *in vitro* or *in vivo*, in terms of their ability to overcome the BBB or enhance drug concentrations in brain tissue. Studies were excluded if they involved drug administration via intranasal, intracranial, pulmonary, or oral routes, or if the formulation was in a pharmaceutical preparation other than lipid nanoparticles. Hybrid nanoparticles were considered if their primary composition and manufacturing method aligned with the context of LNPs.

The first evaluation in the selection process was reviewing titles and abstracts. We designed a pre-defined data collection form in Microsoft

Excel® with the information to be extracted during the full text reviewing: author, type of lipid nanoparticle, functionalization category, functionalization strategy, model of evaluation, encapsulated drug, therapeutic goal, size and zeta potential (of fully functionalized nanoparticle), results (changes in permeability or drug delivery), and any other relevant results.

When available, we also included the statistical significance as reported by the authors. In total, 42 studies allowed to obtain at least one value for the permeation enhancement ratio. Some studies allowed to obtain more than one ratio due to the combination of *in vivo* and *in vitro* evaluation strategies or due to comparison of more than one evaluation strategy.

We compiled these ratios into a database along with study-specific formulation variables like particle size, zeta potential, functionalization moiety, functionalization category, type of BBB model, and specific model. These data were further analysed using Minitab® Statistical Software 21.4.3.0. We conducted a Principal Component Analysis (PCA) with a correlation matrix to explore data patterns and variable correlations. We used loading and score plots to visualize data correlations. To assess significance, we examined eigenvalues and utilized scree plots. Additionally, we used an outlier plot to discard the influence of outliers on the conclusion. Furthermore, a Classification and Regression Tree (CART)® analysis quantified the relative influence of the selected variables and helped visualize additional variability. Finally, variance and main effects analysis further demonstrated different responses among the selected variables.

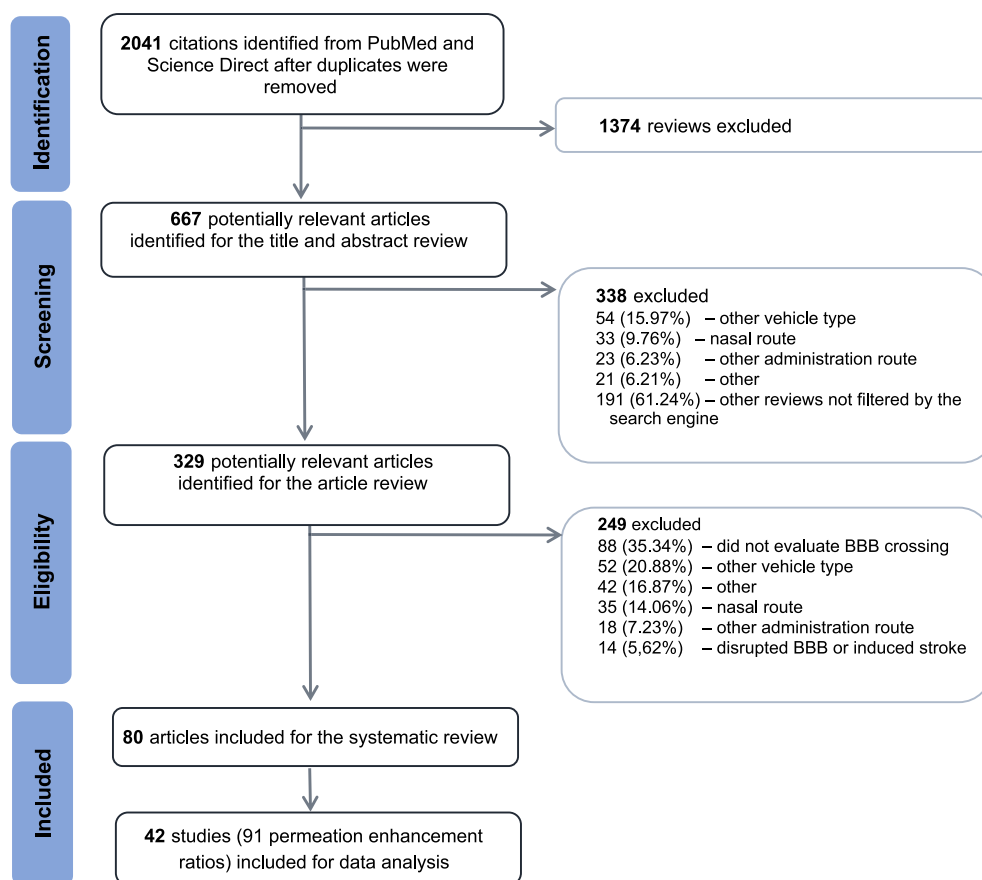


Fig. 1. Flowchart of systematic literature review. Initially, 80 research papers were selected for the systematic review; with 42 fit for data analyses focused on evaluating data correlations and their impact on permeation enhancement ratios. Besides excluding other reviews, the primary reasons for study exclusions were the use of other vehicle type, administration through the nasal route and the absence of an evaluation strategy to assess BBB passage.

2.2. Bibliometric study results

Fig. 1 illustrates the process conducted to identify the 80 studies included for data extraction on functionalization strategies to overcome the BBB, as well as 42 studies for data comparison. We excluded studies that, although demonstrating therapeutic efficacy in evaluation models (e.g., studies: (Kaur et al., 2018; Barbosa et al., 2023; Di Filippo et al., 2022; Scioli Montoto et al., 2018) did not directly measure changes in brain concentrations. Such studies are notable for assessing therapeutic utility, but since their efficacy cannot be uniquely attributed to BBB permeability or due to systemic influence, they fell outside the scope of our review. Studies involving direct administration within the BBB (e.g., study (Byrnes et al., 2023) were excluded. Similarly, studies where the BBB was mechanically or chemically disrupted (e.g., studies (Nong et al., 2023; Hatami Nemati et al., 2023; Sun et al., 2022; Li et al., 2023; Zhang et al., 2023; Nong et al., 2024) were also excluded based on the premise that results from these methods might not be directly applicable to systemic administration. In addition, a considerable number of studies did not meet our eligibility criteria due to their focus on the nasal route (68 in total). While these studies fall outside the scope of this review, we acknowledge the significance of exploring the nasal route for brain drug delivery.

All 80 publications reviewed were categorized as shown in Fig. 2, where peptides, proteins, and antibodies emerged as the most used strategies. All categories are analyzed in the subsequent sections, and the principal features of the studies within each category are presented in their respective tables. The last category (No functionalization/standard modifications) encompasses studies that either do not employ any functionalization methods or utilize surfactants and PEGylation as their chosen strategies. This classification is established since surfactants and PEGylation are regularly used in diverse nanoparticle formulations. Their frequent utilization implies that many other functionalization strategies incorporate PEG or surfactants. This is observed in most of the studies listed across the other categories, thereby justifying their classification under this last category.

Another important criterion in our analysis was the execution of an evaluation method, either *in vitro* or *in vivo*, for assessing changes in nanoparticle and drug passage across the BBB. Among the 80 reviewed studies, the most prevalent method was *in vivo* models, primarily rat and

mouse models. Notably, 15 studies combined both *in vivo* and *in vitro* models in the same publication (see Fig. 3).

3. Overview of study results by functionalization category

Each functionalization category is examined to understand its relative effectiveness and unique contributions to the study of BBB permeability enhancement. This section presents a critical evaluation of each study results. It also highlights emerging trends and potential gaps in current research, paving the way for future innovations in CNS drug delivery systems.

Typically, the selection of a specific functionalization strategy for brain delivery aims to target a particular moiety that is either exclusively present or overexpressed on the BBB (Teixeira et al., 2023). This approach predominantly achieves transportation through receptor-mediated transcytosis (Ding et al., 2020). For instance, the transferrin receptor is widely expressed in ECs and is implicated in the passage of transferrin, a glycoprotein involved in iron transport through the body (Teixeira et al., 2023). This receptor can be targeted using peptides (Neves et al., 2021; Arduino et al., 2020; Sela et al., 2023; Pinheiro et al., 2020; Jain et al., 2023; Kuo et al., 2020), proteins (Muntoni et al., 2019) or antibodies (Marino et al., 2019; Loureiro et al., 2017; Wu et al., 2019). Other examples include insulin and folate receptors, which are highly expressed on ECs and play a vital role in the provision of essential nutrients for brain metabolism (1). The rationale behind the selection of each ligand included in this review is well documented in the scientific literature. Readers are encouraged to consult published reviews that focus on describing various ligands. Additionally, most of the studies listed in Tables 1–5 provide their own specific rationale, complementing the theoretical basis of each approach. Given the scope and breadth of this review, we will not explore the biochemical basis for selecting a given strategy. Instead, we will concentrate on assessing the relative efficacy of each strategy and analyzing the potential for comparison.

3.1. Peptide-modified LNPs

Peptides, composed by a sequence of amino acids, possess unique features that placed them between small molecules and proteins (Sánchez-Navarro et al., 2017; Wang et al., 2022). As small fragments of

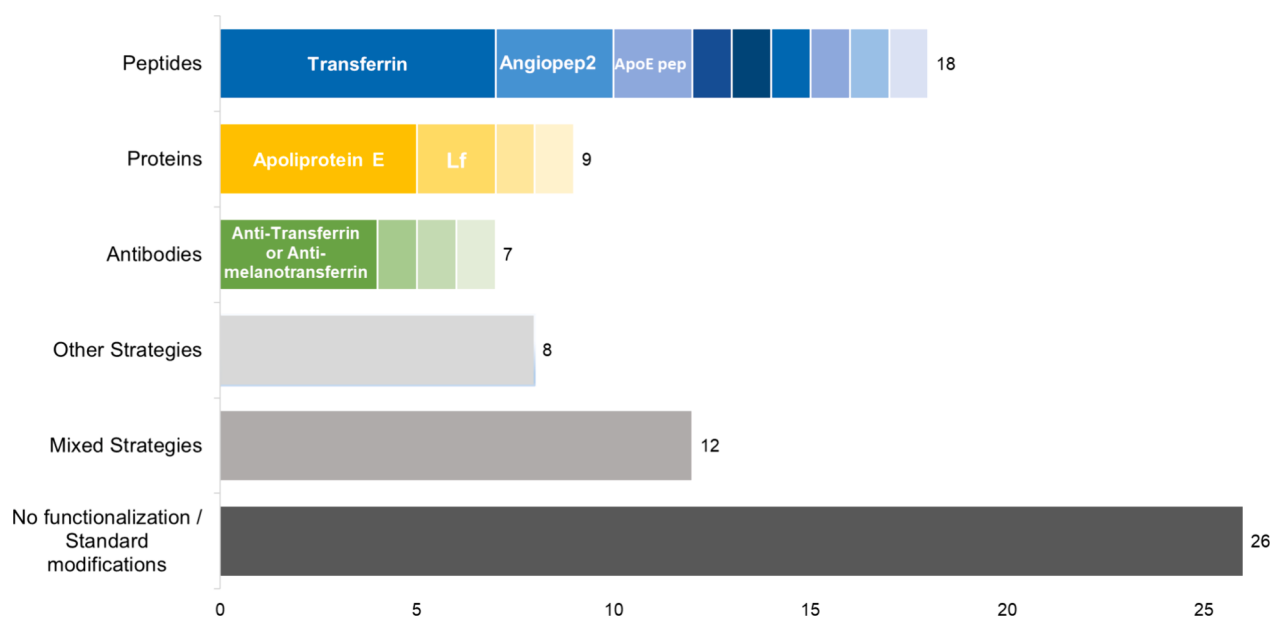


Fig. 2. Categories of Functionalization Strategies in Lipid Nanoparticles for Overcoming the BBB. The most prevalent strategies in the main categories (peptides, proteins and antibodies), are highlighted. Refer to Tables 1 to 5, and S1, for detailed information on the employed strategies in each study. ApoE: ApolipoproteinE; Lf: lactoferrin.

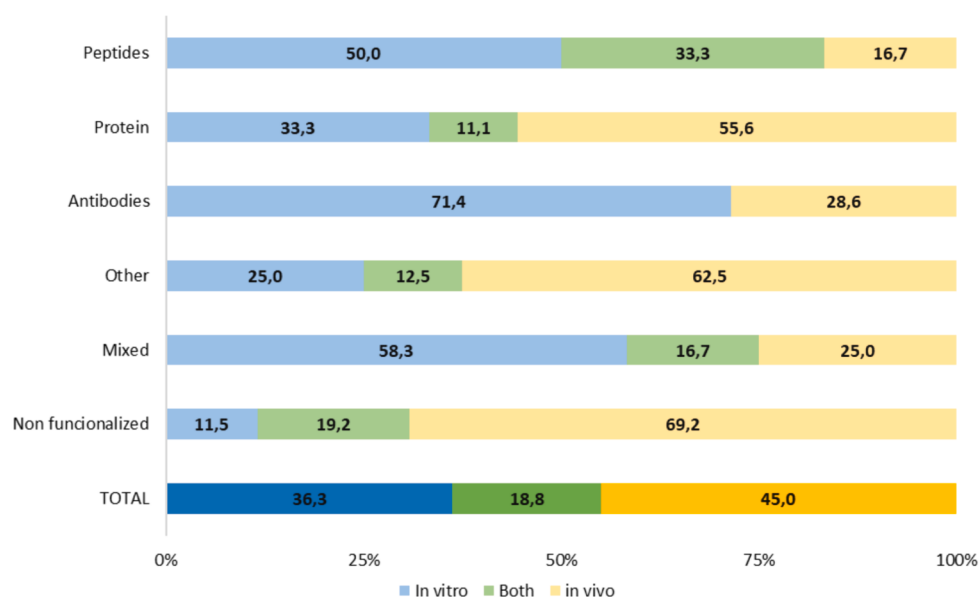


Fig. 3. Distribution of Study Types by Functionalization Category. The figure shows the percentage of studies employing *in vitro*, *in vivo*, or a combination of both evaluation methods across different functionalization categories of lipid nanoparticles. The categories of proteins, other and unfunctionalized show higher prevalence of *in vivo* methodologies.

proteins, they regulate protein interactions with specific receptor sites (Apostolopoulos et al., 2021). Their use as a modification strategy of LNPs has reported some advantages over other functionalization strategies, such as high stability, low immunogenicity, and relatively simple production methods. However, they may show lower target affinity or selectivity and fast systemic clearance (Pucci et al., 2020; Apostolopoulos et al., 2021; Accardo et al., 2013). Several peptide-based modified LNPs have been developed as a strategy to overcome the BBB, as shown in Table 1. The results in this table reveal a trend of increased drug or nanoparticle permeability with peptide functionalization compared to unfunctionalized values in most of the listed studies. However, apart from functionalization itself, the extent of permeability enhancement could also be influenced by various factors. These factors include the evaluation model used in the research, the choice of reference controls, the nanoparticle composition, and the baseline permeability exhibited by the free drug. For instance, Fig. 4 illustrates how the magnitude of permeation enhancement may be affected by the nature of the lipid nanoparticle (Fig. 4-A) or the baseline permeability of each individual drug (Fig. 4-B).

Regarding the evaluation model, Table 1 and Fig. 3 shows a notable prevalence of *in vitro* models for the peptide category. Although six studies combined both strategies, three of them did not quantify the specific changes in permeability for at least one of the models. As a result, only three studies allowed an *in vivo* – *in vitro* correlation (IVIVC). Consequently, it is difficult to derive a generalized conclusion. Studies from Arora and Singh, 2021 and Kato et al., 2023 showed reasonably similar results. They demonstrated a relatively good IVIVC of 1.3–1.5-fold, versus 2-fold, and 5–6-fold versus 3.9-fold, respectively. Results from the study by Dal Magro et al., 2017 were contradictory. The study showed a particularly high permeability enhancement in the *in vitro* model that did not correlate with the *in vivo* results, where no permeability increase was reported. Functionalization did not improved brain passage after intravenous administration route but showed promising results for the nasal route. However, it is important to remark that cell cultures and animal models were not the same across these publications.

There are also examples of negative results in the *in vitro* evaluations of BBB permeability. For example, the results reported by Pinheiro et al., 2020 showed that the inclusion of transferrin might have reduce the permeability of their NLCs. They hypothesized that this reduction might be due to receptor desensitization induced by the quantity of transferrin.

They pointed to literature that claims that endogenous transferrin can, in fact, caused saturation of the receptors (Loureiro et al., 2015). In the case of the study conducted by Arduino et al., 2020 using the same transferrin targeting peptide, their nanoparticles failed to cross to the lower compartment of their cellular model (the equivalent to the brain side of the BBB). However, they tended to accumulate inside the endothelial cells and successfully targeted the expression of MC11 transporters inside the cells. Thus, despite no increase in permeability, their affinity for brain endothelial cells could still be exploited as an advantage for future therapies. Analogous assumptions could be made for other studies excluded from the main results of this review because they did not include a barrier model. These studies directly tested and probed the affinity of their nanoparticles in a traditional cell culture of hCMEC/D3, like the one carried out by Gomes et al., 2017.

Another noteworthy finding from the analysis of Table 1 is the BBB permeability comparison of nanostructured lipid carriers (NLCs) and solid lipid nanoparticles (SLNs). All the studies listed on Table 1 that evaluate both types of nanoparticles arrived at the same conclusion: with and without functionalization, NLCs showed higher permeability results than SLNs. The authors suggest that the higher results observed for NLCs compared to SLNs could be explained by changes in nanoparticle crystallinity, conjugation capacity, and also better drug loading/release properties (Neves et al., 2021; Pinheiro et al., 2020; Pinheiro et al., 2020). An example of these differences between NLCs and SLNs is illustrated in Fig. 4-A.

Finally, regarding the physicochemical properties of lipid nanoparticles, it is noteworthy that reported sizes of the functionalized nanoparticles mostly range between 100 and 250 nm. Tables 1 to 5 presents physicochemical the values for the functionalized nanoparticles encapsulating the active pharmaceutical ingredient (API). Negative zeta potential values are predominant. Indeed, in 11 of the 18 studies, they reported zeta potential values between –3.5 and –54 mV. When positive values were observed, they were of relatively low magnitudes (0.83–20 mV) (Arora and Singh, 2021).

The study carried out by Bi et al., 2023 exhibited a notable difference compared to the other studies listed in Table 1. Firstly, they incorporated peptides as lipopolymers containing polysarcosine as an alternative to PEGylated lipids. Their aim was to achieve less immunogenicity while retaining the stealth and stabilization properties typically conferred by PEGylation. They found that as the length of the polysarcosine chain or

Table 1

Comparative analysis of key study features for peptide-modified lipid nanoparticles to overcome the BBB.

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Neves et al. (2021)	SLNs and NLCs	SLNs 162 ± 6 nm; −29 ± 5 mV NLCs 183 ± 12 nm; −21 ± 2 mV	Transferrin targeting peptide (Tf)	Curcumin	<i>In vitro</i> hCMEC/D3	In both systems (NLCs and SLNs), the permeability profile increased by 1.5-fold with Tf functionalization. Permeability calculations were based on drug concentrations measured in the luminal and abluminal chambers over 4-hour period. For both functionalized and plain samples, NLCs showed higher permeability than SLNs (see Fig. 4A).	The free curcumin results were higher than those encapsulated in plain NLCs and SLNs, but slightly lower compared to the functionalized systems.
Arduino et al. (2020)	NLCs	118.4 ± 2.1 nm; −38.6 ± 0.9 mV	Transferrin targeting peptide (Tf)	Anti-Alzheimer disease ligand: MC111	<i>In vitro</i> CMEC/D3	According to the permeability coefficient, fluorescent pattern of NPs and drug distributions, the authors claim that in this specific case, the Tf functionalization limited the delivery of NLCs to the lower compartment of the model. Only unfunctionalized NLCs crosses into the lower compartment of the cellular model (which corresponds to the CNS). NLCs showed higher permeability than SLNs*. Authors concluded that there was no increase in permeability due to transferrin functionalization [†] . Calculations were based on NPs quantification in the abluminal chamber by fluorescence analysis over 4-hour period.	Delivering MC111 in NLCs increased the expression of P-gp and BCRP proteins on endothelial cells of the BBB model, which was the expected result of MC111 delivery. Particularly, the functionalization of NLCs with Tf showed the highest effectivity.
Pinheiro et al. (2020)	SLNs and NLCs	SLNs: 234 ± 18 nm −32 ± 8 mV NLCs: 219 ± 13 nm; −28 ± 2 mV	Transferrin targeting peptide (Tf)	Quercetin	<i>In vitro</i> hCMEC/D3	NLCs showed higher permeability than SLNs*. Authors concluded that there was no increase in permeability due to transferrin functionalization [†] . Calculations were based on NPs quantification in the abluminal chamber by fluorescence analysis over 4-hour period.	The amyloid-beta studies demonstrated that the quercetin-loaded nanoparticles successfully inhibited fibril formation and decrease peptide aggregation, avoiding an aggregation effect of unloaded nanoparticles. This efficacy was particularly higher in Tf-NLCs, compared to Tf-SLNs and un-functionalized nanoparticles.
Jain et al. (2023)	NLCs	84 ± 9 nm; −3.5 ± 0.9 mV	Transferrin targeting peptide (Tf)	i. Rivastigmine ii Resveratrol	<i>In vivo</i> Wistar rats (female)	Functionalization with transferrin led to a 1.7-fold*** increase in brain uptake compared to a unfunctionalized NLCs, and a 2.9 [§] increase compared to free fluorescent dye. Uptake calculations were performed by analyzing brain tissue via confocal microscopy, with animals being sacrificed 6 h post-injection.	Lyophilized samples of the nanoparticles were evaluated up to 6 months under different storage conditions.
Sela et al. (2023)	Liposomes	113.5 ± 1.5 nm; Zeta potential was not reported	Transferrin targeting peptide (Tf)	Monoclonal antibody SynO4 ¹	<i>In vitro</i> BMECs <i>In vivo</i> mice C57/6JOLA ^{Hsd} (female)	Tf-functionalized liposomes crossed the BBB model, showing increasing penetration over a 24-hour period (<i>in vitro</i> results did not include a comparison with unfunctionalized liposomes). In mice with an induced Parkinson's disease model, the accumulation of functionalized liposomes was 3-fold [#]	In the induced Parkinson's disease model, administering Tf-liposomes decelerated disease progression, lessened both intracellular and extracellular alpha-synuclein aggregation, and mitigated neuroinflammation. The authors also proved that Tf-liposomes led to enhancements in motor

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
						higher compared to unfunctionalized liposomes, while the antibody content in brain tissue was 2.3-fold higher for the same comparison. Accumulation calculations were performed by imaging extracted organs using <i>in vivo</i> imaging system, with animals being sacrificed 12 h post-injection.	functions and cognitive capabilities of treated mice.
Kuo et al. (2020)	Dual phase SLNs	Between 174.3 and 205.47 nm; About −42 and −30 mV	Transferrin targeting peptide (Tf)	i Curcumin ii Quercetin iii Rosmarinic acid iv Nerve growth factor	<i>In vitro</i> HCVP/hCMEC/HA	The functionalized NP showed an increase in permeability for both free drug and unfunctionalized NP (in the latter case up to 3-fold* & **). Loaded unfunctionalized nanoparticles showed a decrease in free drug permeability for curcumin and quercetin, and a slightly increase for rosmarinic acid and nerve growth factor (see Fig. 4B). Permeability calculations were based on drug concentrations measured in the luminal and abluminal chambers over 4-hour period	Each drug was encapsulated in different formulations for permeation studies, and in a single formulation for evaluation of proliferations and protective effect studies. Encapsulation reduced the cytotoxicity of the evaluated drugs. The combined effect of all encapsulated drugs showed an effect in protecting degenerated SK-N-MC cells. The formulation also included cardiolipin to improve affinity to β-amyloid peptide. In their formulation studies, the authors explored different HLB lipid values and other formulations variables and their effects on nanoparticle properties.
Mendes et al. (2024)	NLC	61 ± 1 nm; −18 ± 2 mV	Transferrin targeting peptide (Tf) ²	Celecoxib	<i>In vitro</i> hBMECs	Transferrin targeting peptide increased the apparent permeability of unmodified NLC by 1.5-fold*. Permeability calculations were based on celecoxib measurements in the abluminal chamber over a 4-hour period.	Authors conclude that targeting molecules protects NLCs from protein corona formation. In addition, they found that cell-penetrating peptides reduce the ability of unmodified NLCs to cross the cellular model of the BBB. They also compared internalization pathways in hBMECs and U87 cell lines, and finally suggest that a dual functionalization approach optimizes glioblastoma targeting by enhancing BBB crossing and tumor specificity.
Pucci et al. (2020)	Lipid based nanovectors ³	179 ± 3 nm; −39.0 ± 0.8 mV	Angiopep2	nutlin-3a (rebemadlin) Iron oxide nanoparticles	<i>In vitro</i> hCMEC/D3 + astrocytes + U87MG + SH-SY5Yd	The nanovector concentration crossing the BBB model, calculated by fluorescence intensity, was 1.19 higher* compared to unfunctionalized nanovectors.	Targeting capacity for U87MG and SH-SY5Yd cells before and after passing the hCMEC/D3. The penetration capacity remains unchanged after passing through the barrier culture. Compared to unmodified cores, the functionalization increased BBB permeability and targeting capacity for U87MG cells, and showed no effect for SH-SY5Yd cells. Authors proved the <i>in vitro</i> chemotherapeutic efficacy of the nanovectors, including magnetic stimulation.

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Kadari et al., (2018)	SLNs	111.4 ± 3.2 nm; −16.4 ± 1.2 mV	Angiopep2	Docetaxel	<i>In vivo</i> Tissue distribution in male C57BL/6 mice	The accumulation of docetaxel in brain tissue after one hour was 2.44 times higher [§] when comparing functionalized and unfunctionalized SLNs, and 4.07 times higher compared to free drug administration. Real-time fluorescence imaging showed a significant increase in intracranial intensity with functionalized SLNs.	<i>In vitro</i> apoptosis studies in U87MG and GL261 cells showed better efficiency for decorated SLNs compared to free drug and plain SLNs. The antiangioma efficacy of the formulations was evaluated in an animal model (mice) where functionalized formulations showed a significantly higher survival time than plain SLNs and free drug.
Du et al. (2024)	Liposomes	About 120 nm; Zeta potential was not reported	Angiopep2 ⁴	None	<i>In vitro</i> bEnd.3 <i>In vivo</i> ICR mice	Authors found that the length of the polyethylene glycol (PEG) chain in Angiopep2 modified liposomes influence their ability to cross the BBB. Both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> results showed higher accumulation for liposomes with longer PEG chains. Results did not include comparison with unmodified liposomes.	Contrary to the observed with the BBB <i>in vitro</i> crossing, liposome internalization in U87MG cells was higher for shorter PEG chains. <i>In vivo</i> tumor accumulation also correlated with PEG chain length, showing higher accumulation for longer PEG chains.
Dal Magro et al. (2017)	SLNs	119.7 ± 2.5 nm; −54.3 ± 2.1 mV	Apolipoprotein E-derived peptide	None	<i>In vitro</i> hCMEC/D3 <i>In vivo</i> Male Balb/c mice (biodistribution)	<i>In vitro</i> Functionalization with the Apo-E derived peptide increased permeability in the studied model by about 9.5 to 14 times** compared to control SLNs. Permeability calculations were based on radioactivity measurements in the abluminal chamber over a three-hour period <i>In vivo</i> Functionalization did not improve brain accumulation in the intravenous administration route. Intraperitoneal injection showed no accumulation with or without modification. Accumulation assessments were performed using fluorescent molecular tomography.	Internalization studies suggested that the primary mechanism by which SLNs-mApoE entered hCMEC/D3 was through a clathrin-mediated endocytosis. For intravenous administration route, the brain nanoparticle accumulation after 1 h was 0.67 % for plain SLNs and 0.15 % for ApoE-functionalized SLNs. After 4 h, the accumulation was 0.15 % for plain SLNs and 0.05 % for functionalized. On the other hand, the intratracheal instillation administration route reached brain concentrations equivalent to 1.38 % (plain) and 4.53 % (functionalized) after 1 h, and 0.36 % (plain) and 1.75 % (functionalized) after 24 h. Inflammatory reactions did not increase in mice treated with nanoparticle formulations compared to control (saline solution).
Kato et al. (2023)	Liposomes	Between 76.1 ± 2.9 and 84.5 ± 6.6 nm; Between −0.16 ± 1.35 and 0.825 ± 1.08 mV	Apolipoprotein E mimetic peptide	None	<i>In vitro</i> hCMEC/D3 <i>In vivo</i> mice ddY (male)	In the <i>in vitro</i> model, functionalization with 0.25 % mol, 0.5 % mol, and 1 % mol of Apolipoprotein E mimetic peptide enhanced the permeability of plain liposomes by approximately 5 to 6-fold***. This increase was measured by fluorescent intensity in the abluminal chamber after 24 h. <i>In vivo</i> results shows brain accumulation of 3.9-fold**, measured using	Before focusing on peptide-modified liposomes, the authors assessed the BBB <i>in vitro</i> permeability of eight different peptides, ultimately selecting the Apolipoprotein E mimetic peptide due to its higher permeability results. In mice, the authors demonstrated the capability of ApoEdp-modified PEGylated liposomes to penetrate beyond the BBB. This was able due to the use of three-dimensional

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Reginald-Opara et al. (2022)	Liposomes	107.7 ± 8.4 nm; −30.9 ± 1.0 mV	Glutathione	None	<i>In vitro</i> hBMECs	fluorescent intensity of brain homogenate of mice scarified 24 h after injection. Glutathione covered liposomes cross BBB model. No comparison without glutathione is included in this work. Further references to the direct effect of glutathione presence are available in previously published works referenced by the authors (Gaillard et al., 2014; Salem et al., 2015; Maussang et al., 2016).	imaging with tissue clearing. This study describes transport mechanisms related to pH responsiveness of the lipid core. Their main conclusion is that only the non pH-responsive lipid core were exocytosed from the cells as whole particles.
Pinheiro et al. (2020)	SLNs and NLCs	SLNs 201 ± 23 nm; −25 ± 7 mV NLCs 222 ± 22 nm; −25 ± 3 mV	Rabies virus glycoprotein (RVG)	Quercetin	<i>In vitro</i> hCMEC/D3	Compared to their respective unfunctionalized nanoparticles, RVG functionalization resulted in a 1.5-fold* increase in the permeation of both SLNs and NLCs into the abluminal chamber, measure by fluorescence intensity over 4-hour period. NLCs showed higher permeability than SLNs. The permeability of plain NLCs was comparable to that of SLNs-RVG.	In both NLCs and SLNs, functionalization improved beta-amyloid inhibition (thioflavin T binding inhibition assay) compared to the plain nanoparticles. The results of RVG-NLCs and RVG-SLNs were comparable to free drug inhibition.
Tang et al. (2024)	Lipid nanoparticles ³	130.1 ± 4.84 nm; Approx. + 37 mV	DAT peptide (based on transmembrane peptide DP7)	siRNA	<i>In vitro</i> bEnd.3 <i>In vivo</i> female C57BL/6 J mice	Functionalization with DAT enhanced NPs permeability across the BBB model by approximately 1.5-fold**. This increase was measured by the changes in fluorescence intensity of GL261 cells cultured in the abluminal chamber. Ex vivo analysis of brain tissue 4 h after administration revealed minimal accumulation for naked siRNA. There was an increased signal for the LNPs and a bigger signal for the DAT-modified LNPs. Fluorescence measures were unquantified.	Authors demonstrated that their formulation effectively targets brain tumors and holds promise for glioma immunotherapy. They also evaluated the pathways for peptide internalization, transfection efficiency, endosomal escape, and gene silencing efficacy
Arora and Singh (2021)	Liposomes	Specific reported values range between: 141.3 ± 17.25 nm and 190.8 ± 42.21 nm; 13.1 ± 2.3 mV and 20.5 ± 3.0 mV	i Penetratin (Pen) ii Chimeric rabies virus glycoprotein fragment (RVG9R) iii Rabies virus derived peptide (RDP) iv CGN peptide v Mannose (MAN)	Plasmid encoding VGF protein	<i>In vitro</i> bEnd.3 cells, primary rat glial, and primary rat neuronal cells. <i>In vivo</i> female C57BL/6 mice (Evaluation of VGF expression).	<i>In vitro</i> RVG9R-MAN, RDP-MAN and CGN-MAN modified liposomes increased the transport of plain liposomes by 1.4 to 1.8*. The others showed no difference compared to plain liposomes, crossing at approximately 10 %. Calculations were based on NPs quantification in the abluminal chamber by fluorescence analysis over 24 h <i>In vivo</i> Pen-MAN, RDP-MAN and RVGR9-MAN increased	Tissue observations did not reveal any signs of toxicity from the liposome formulations in the brain, liver, spleen, kidney, heart, or lungs.

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Bi et al. (2023)	Liposomes	Between 110 and 130 nm; Between 25 and 35 mV	Polysarcosine ⁶	mRNA	<i>In vivo</i> Zebra fish	VGF expression in the brain by 2-fold* compared to plain liposomes, saline treatment, and the rest of liposomes. Transfection efficacy was evaluated on the 6th day after administration. The administration in polysarcosine-liposomes with shorter carbon length (14 carbons) and polysarcone length (2 k) resulted in a 4** to 6-fold*** increase in protein expression in zebrafish embryos.	The polysarcosine-modified nanoparticles exhibited superior <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> transfection rates compared to the PEGylated nanoparticles, particularly showing higher rates for lipids with a 14-carbon chain length with shorter lipophilic chain (2 k). Concerning extended circulation times, lipids with longer carbon chains (18 carbons) and longer lipophilic chain (2 k) proved to be more effective than PEGylation, surpassing shorter carbon chains in efficiency.
Arora et al. (2020)	Liposomes	Specific reported values range between: 136.0 ± 6.9 nm and 178.5 ± 2.3 nm; 8.0 ± 1.2 mV and 17.0 ± 2.0 mV	i Penetratin (Pen) ii Rabies virus glycoprotein (RVG) iii Mannose (MAN) iv Cell penetrating peptide	Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene	<i>In vitro</i> bEnd.3 cells, primary rat glial, female C57BL/6 mice	<i>In vitro</i> , RVG-MAN and PEN-MAN modified liposomes increased transport of plain liposomes by 1.8 to 2*. Transportation was measure by fluorescent intensity in the abluminal chamber. <i>In vivo</i> , RVG-man and PEN-MAN increased brain distribution of lissamine rhodamine dye by approximately 1.5-fold and 2-fold*, respectively, compared to plain liposomes. No significant differences were observed with MAN, PEN and RVG only modified liposomes in both type of models. All formulations included also cell penetrating peptide.	Additionally, the authors assessed the biocompatibility of their liposomes and their cellular uptake. They also measured transfection efficiency in both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> settings, observing higher efficiency in RVG-MAN and PEN-MAN modified liposomes.

Notes:

Abbreviations: Apo: apolipoprotein; BBB: Blood-brain barrier; Bend.3: Brain endothelial cells derived from mice; CNS: Central nervous system; HA: Human astrocytes; hBMECs: human brain microvascular endothelial cells; HBVP: Human brain vascular pericytes; hCMEC/D3: Human cerebral endothelial cells; HLB: hydrophilic-lipophilic balance; LNPs: lipid nanoparticles; MAN: Mannose; NLCs: Nanostructured lipid carriers; NP: Nanoparticles; PEG: polyethylene glycol; Pen: Penetratin; RDP: Rabies virus-derived peptide; mRNA: Messenger ribonucleic acid; RVG: rabies virus glycoprotein; siRNA: small interfering ribonucleic acid; SLNs: Solid lipid nanoparticles; Tf: Transferrin targeting peptide; VGF: nerve growth factor.

Reported statistically significant permeability improvements (p value: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001; # < 0.0005; § < 0.0001).

† Authors report no statistically significant change in permeability (p value ≥ 0.05).

1- Monoclonal antibody targeting alpha-synuclein aggregation (encapsulated drug), which is a signature characteristic of Parkinson's disease progression.

2- Authors also include functionalization with 5 different types of cell penetrating peptides and tumor targeting peptide (RGFfK) for glioma targeting.

3- Not categorized, possibly corresponds to SLN.

4- Authors evaluate different Angiopep2 coated liposomes varying the length of PEG chain included in the formulation of liposomes.

5- This study reports the result of ten different formulations from five different functionalization alternatives proposed by the authors: plain liposomes, five corresponding to each of the individual alternatives, and four combinations with mannose (Pen-MAN, CGN-MAN, RVGR9-MAN and RDP-MAN). Specific values for particle size and zeta potential for each combination can be found in the respective reference.

6- Polysarcosine was incorporated to the nanoparticles as peptide-lipid lipopolymer. Several lengths of the lipid chain were evaluated in this publication as alternatives for the use of PEGylated lipids.

Table 2

Comparative analysis of key study features for protein-modified lipid nanoparticles to overcome the BBB.

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size;Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Neves et al. (2017)	SLNs	SLNs-Palmitate-ApoE: 174.2 ± 10.3 nm; −11.46 ± 2.56 mV SLNs-DSPE-ApoE: 164.8 ± 22.2 nm; −11.46 ± 2.56 mV	Apolipoprotein E (ApoE)	None	<i>In vitro</i> hCMEC/D3	The apparent permeability coefficient increased by 1.4 times for SLNs-Palmitate and by 1.5* times for SLNs-DSPE when functionalized. The apparent permeability coefficient calculations were based on NPs quantification in the abluminal chamber by fluorescence analysis over 4-hour period. The cellular uptake in hCMEC/D3 model cells showed a 1.8-fold increase for SLNs-Palmitate and a 1.9-fold increase for SLNs-DSPE compared to their respective unfunctionalized controls. After internalization, the transcytosis of the SLNs was evaluated using various techniques, revealing their passage through the barrier to the basolateral side of the model.	The authors reported that the internalization of SLNs-Palmitate-ApoE and SLNs-DSPE-ApoE predominantly occurs through clathrin-mediated endocytosis, after evaluating of three potential mechanisms for BBB penetration: clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis, and micropinocytosis. Internalization studies indicated that these ApoE-functionalized SLNs have the ability to cross the BBB without undergoing significant degradation inside the cells, as no major changes in their properties were detected.
Neves et al. (2016)	SLNs	SLNs-Palmitate-ApoE: 217.1 ± 5.8 nm −13.54 ± 1.60 mV SLNs-DSPE-ApoE: 167.8 ± 19.9 nm; −13.05 ± 4.06 mV	Apolipoprotein E (ApoE)	Resveratrol	<i>In vitro</i> hCMEC/D3	Functionalization with ApoE increased drug permeability by 1.8-fold* (for both types of lipids) compared to unfunctionalized SLNs and the free drug (similar permeability results for free drug and unfunctionalized SLNs). Calculations were based on drug quantification in the abluminal chamber over 4-hour period.	
Rajora et al. (2017)	Porphyrim-lipid nanoparticles ²	Discoidal shape: 28 ± 8 nm; Spherical shape: 29 ± 9 nm;Zeta potential was not reported	Apolipoprotein E3 (ApoE3)	None	<i>In vivo</i> U87-GFP orthotopic tumour-bearing mice	Animal studies demonstrated an accumulation ratio of 4:1, favouring tumour tissue over healthy tissue. <i>In vivo</i> accumulation of functionalized nanoparticles in the brain accounted for approximately 3 ± 1 % of the total administered dose. This study did not include a unfunctionalized control group to assess brain accumulation of nanoparticles without ApoE3.	The authors conducted a comparative assessment of cellular uptake using U87GM cells and IdIA7 cells (hamster ovary cells characterized by low expression of the LDL receptor, which serves as the target for ApoE3 functionalization). Notably, the cellular uptake of spherical nanoparticles (containing colesterylolate) was found to be 3 to 4 times higher in U87GM cells compared to IdIA7 cells. In the case of discoidal nanoparticles, uptake increased by 2.3-fold in LDL-expressing cells. The authors further demonstrated that the uptake mechanism of the nanoparticles involved receptor-mediated transcytosis, which could be inhibited by either LDL competition or acetylation of ApoE3 moieties on the nanoparticles. In terms of effectiveness, <i>in vitro</i> photodynamic therapy treatment resulted in a 83 % reduction in the viability of u87MG cells.

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size;Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Athalye et al. (2024)	Lipid nanoparticles ³	131.6 ± 1.2 nm; −15.6 ± 0.09 mV	Apolipoprotein E3 (ApoE3)	Levetiracetam	<i>In vivo</i> Wistar rats	Compared to unmodified nanoparticles, ApoE3-modified nanoparticles increased brain concentrations of levetiracetam in 1.26-fold, after 1 h. Compared to free levetiracetam, unmodified and functionalized NPs enhanced brain concentrations by 2-fold* and 2.59-fold*, respectively.	The authors evaluated the release kinetics of the levetiracetam from their NPs, and their cytotoxic effects on HEK293 cell lines. Additionally, they examined <i>in vivo</i> safety by evaluating haemolysis and necrotic effects.
Dal Magro et al., (2018)	Lipid nanoparticles ⁴	211.3 ± 3.5 nm; 10 ± 0.7 mV	Apolipoprotein E4 (ApoE4)	None	<i>In vivo</i> Male BALB/c mice	The functionalization with ApoE4 led to a 3-fold** higher brain accumulation of nanoparticles at 30 min. Three different concentrations of ApoE4 (5, 10 and 20 µg/mL) were tested. The highest accumulation was observed at the lower ApoE4 concentration (5 µg/mL). Brain accumulation was quantified using immunohistochemistry and fluorescence measurements of brain tissue from animals sacrificed 30 min after administration.	The authors demonstrated in hCMEC/D3 cell culture that the principal mechanism for BBB penetration of the ApoE4-modified nanoparticles was clathrin-mediated endocytosis. In contrast to the findings in brain accumulation, liver and intestine accumulation showed a direct correlation with increasing quantities of ApoE4.
Singh et al. (2016)	SLNs	121.0 ± 5.6 nm; −21.5 ± 1.2 mV	Lactoferrin (Lf)	Docetaxel (DTX)	<i>In vivo</i> Female Swiss albino mice	The area under the curve of docetaxel in the brain was approximately 2.27-fold* higher compared to unfunctionalized SLNs, over 8-hour observation period. After a one-hour interval, the administration of free docetaxel resulted in brain concentrations comparable to those achieved with functionalized SLNs. However, in contrast to both nanoparticle formulations, the administration of free drug showed no appreciable brain accumulation at 2, 4, or 8 h.	Functionalization of SLNs increased both cellular uptake and apoptosis in studies conducted on U87MG cells. Additionally, both SLNs formulations exhibited higher apoptotic effects compared to the free drug. The encapsulation of docetaxel in SLNs resulted in an increase in its plasma half-life from 1.89 to approximately 2.3 h. The authors also evaluated the stability of the nanoparticles in both normal saline and 10 % serum. The study presents the findings regarding nanoparticle accumulation in various major tissues within the <i>in vivo</i> model.
Zhao et al. (2018)	NLCs	170 ± 14 nm; −15.9 ± 1.1 mV	Lactoferrin (Lf)	Nimodipine (NMD)	<i>In vivo</i> Biodistribution on BALB/c nude mice	Although the intensities were not quantified, whole-body imaging revealed that lactoferrin-functionalized NLCs exhibited higher brain accumulation , 24 h after administration. The second-highest accumulation was observed with PEGylated but unfunctionalized NLCs, while the least accumulation was observed with unfunctionalized NLCs without PEGylation.	The cellular uptake of lactoferrin-functionalized NLCs in PC12 cells resulted in a 1.5-fold increase in internal fluorescence. However, the authors discovered that beyond a certain Lf content (specifically, higher than > 100 µg/ml), the cellular uptake decreased. <i>In vitro</i> serum stability determination was included in the study. Formulations were tested in a mice stroke induction model using sodium nitroprusside. Functionalized NLCs containing nimodipine improved viability by more than 30 %.

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size;Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Muntoni et al. (2019)	SLNs	PEGylated linker: Transferrin: 500 ± 45 nm Insulin: 445 ± 41 nm Non PEGylated linker: Transferrin: 437 ± 55 nm Insulin: 429 ± 8 nmZeta potential was not reported	i Transferrin ii Insulin	Didodecyl-methotrexate	<i>In vitro</i> hCMEC/D3 <i>In vivo</i> Male Wistar rats	<i>In vitro</i> results showed that encapsulation itself caused a 3.52-fold* increase in drug permeability compared to free drug. However, when SLNs were functionalized with any of the four different linker/protein combinations, there was a reduction in permeability compared to unfunctionalized SLNs, showing a 1.5 to 1.9* increase compared to the free drug. Permeability calculations were based on drug concentrations measured in the abluminal chamber over 24-hour period. SLNs functionalized with insulin or transferrin with a PEGylated linker showed the highest <i>in vivo</i> brain accumulation (approximately 1 % of the total dose retained by gram of tissue) compared to functionalized non-PEGylated, unfunctionalized, and free drug. Brain accumulation was determined through prior derivatization and HPLC fluorimetric analysis.	For all cases, the highest drug accumulation was found in the spleen, liver and lungs. Functionalization increased the accumulation in the above organs regardless of the type of linker or protein used for functionalization.
Kuo et al. (2021)	Liposomes	About approximately 150 to 190 nm; About approximately 18 to −42 mV ⁵	Leptin	i Resveratrol ii Epigallocatechin gallate(EGCG)	<i>In vitro</i> HBMECs/HA/ HBVPs	For EGCG, encapsulation only increased permeability by about 10-fold compared to the free drug, while the inclusion of leptin increased permeability 2-fold* compared to plain liposomes. For resveratrol, encapsulation reduced the permeability of the free drug by 50 %. Functionalization increased the permeability of plain liposomes, but it did not represent a significant change compared to free resveratrol [†] . Permeability coefficients were calculated using drug concentrations measured in the abluminal chamber over 4-hour period	Treatment with the leptin-modified liposomes containing resveratrol and EGCG increased the survival rates of SH-SY5Y cells treated with 1-methyl-4-pyridinium from 67.78 % to more than 80 %. Moreover, the treatment evidenced downregulation of pro-apoptotic factors and upregulation of apoptosis inhibitors.

Notes:

Abbreviations: Apo: apolipoprotein; BBB: Blood-brain barrier; DSPE: 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; EGCG: Epigallocatechin gallate; HA: Human astrocytes; HBMECs: Human brain microvascular endothelial cells; HBVP: Human brain vascular pericytes; hCMEC/D3: Human cerebral endothelial cells; Lf: Lactoferrin; DTX: Docetaxel; NLCs: Nanostructured lipid carriers; NMD: Nimodipine; NP: Nanoparticles; SLNs: Solid lipid nanoparticles.

Reported statistically significant permeability improvements (p value: * < 0.05; ** < 0.01).

† Authors report no statistically significant change in permeability (p value ≥ 0.05).

1- Tamoxifen was included as a functionalization strategy to enhance brain accumulation due to its inhibitory capacity on multidrug resistance-related proteins (MRPs), which are involved in expelling substances that cross the BBB.

- 2- The photophysical properties of porphyrins allow their inclusion in theragnostic applications. Two groups of lipid nanoparticles (discoidal and spherical) were prepared. The spherical morphology was a result of a change in the composition due to the inclusion of cholesteryl oleate in the nanoparticles. Spherical forms were the only variant used in the *in vivo* evaluation due to their higher uptake by U87GM cells.
- 3- Cetyl palmitate nanoparticles were prepared by high-pressure homogenization technique and stabilized with polysorbate 80.
- 4- The authors reported different values for lipid composition, particularly regarding the percentages of 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine and dihexadecyl phosphate (DHDP) in the formulation
- 5- Contrasting with other categories, the investigation of specific internalization and transport pathways is particularly emphasized in protein-functionalized lipid nanoparticle studies (Zhao et al., 2018; Dal Magro et al., 2018; Rajora et al., 2017; Neves et al., 2017). For example, Neves et al (Neves et al., 2017) found that clathrin-mediated endocytosis appeared to be the primary route for SLNs internalization. Moreover, SLNs functionalized with ApoE demonstrated increased uptake, likely due to its interaction with LDLR located in clathrin-coated pits on the cell surface.

the lipid carbon tail increased, there was a decrease in transfection efficiency. This decrease was offset by an increase in circulation time. Second, their study included the encapsulation of messenger ribonucleic acid (mRNA). Together with the encapsulation of siRNA in the study by Tang et al., 2024, and the incorporation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene and a protein-encoding plasmid in the studies from Arora and Singh, 2021; Arora et al., 2020, these are the only studies with gene therapy or RNA therapy among the other listed. Most of the other studies primarily focused on small molecule delivery.

3.2. Protein-modified LNPs

Proteins are a larger and more complex class of biomolecules that possess higher target specificity and stronger affinity than peptides (De La Rica and Matsui, 2010). However, they might present some disadvantages, such as potential immunogenicity (Ilinskaya and Dobrovolskaia, 2016) and increased structural complexity (Spicer et al., 2018). Table 2 illustrates the versatility of protein-modified LNPs in enhancing BBB penetration. Overall, protein functionalization consistently enhanced drug permeability and cellular uptake. However, it is notable that there is no clear-cut or linear trend observed among these studies. Importantly, increasing concentrations of the functionalization agent does not necessarily lead to permeability-increasing effects. For instance, Zhao et al., 2018 found that beyond a specific amount of lactoferrin content, competitive binding to receptors appeared to limit BBB penetration. In their formulation, this threshold was higher than 100 µg/mL, tested up to 500 µg/mL. Dal Magro et al., 2018 observed a similar phenomenon, where the highest brain accumulation occurred at the lowest tested ApoE4 concentration (ranging from 5 to 20 µg/mL). In contrast, they found a direct correlation of higher ApoE4 concentrations and their accumulation in other organs, such as the liver and intestine.

In this category, *in vitro* models remain the predominant method to evaluate permeability. Only one study combined *in vivo* and *in vitro* assessments, and it showed a limited IVIVC. *In vitro* results from Muntoni et al., 2019 used two different proteins (insulin and transferrin) with PEGylated and non-PEGylated linker, combining four different strategies within the same study. All combinations showed lower BBB permeability for functionalized nanoparticles compared to unfunctionalized ones. In contrast, the *in vivo* biodistribution results indicated that functionalized nanoparticles with a PEGylated linker (for both proteins) exhibited higher brain concentrations than all other samples. However, it is worth noting that the achieved brain concentration was relatively low in terms of the total dose (less than 1 %).

In line with our previous observations, nanoparticle composition continues to show a significant influence on permeability, as shown by the results reported by Muntoni et al., 2019 and Kuo et al., 2021. In the latter study, the effects of both encapsulation and functionalization vary based on the cargo. Specifically, while encapsulation alone did not affect the permeability of resveratrol, functionalization reduced it. In contrast, for epigallocatechin gallate, encapsulation increased permeability, and subsequent functionalization further enhanced this effect. Beyond composition, properties like shape also play a role, as evidenced in the study from Rajora et al., 2017. They created lipid nanoparticles in both

discoidal and spherical shapes, mirroring the forms of low-density lipoprotein receptor (LDLR) in the brain. Their *in vitro* studies with U87GM and Id1A7 cells (which lack LDLR expression) showed higher uptake of spherical nanoparticles. This was linked to the tertiary structure of apoE3 aligning with the nanoparticles' shape. Notably, these shape changes were achieved by altering the composition, specifically through the addition of cholesteryl oleate.

3.3. Antibody-modified LNPs

Antibodies (Abs) are a unique type of glycoproteins involved in the specialized (adaptive) immune response (Arruebo et al., 2009). Abs become an emerging trend in targeting therapies primarily due to its exceptional specificity (Lu et al., 2020; Marques et al., 2020). One noteworthy observation concerning the studies involving the antibodies listed in Table 3 is the utilization of multiple Abs within the same study. This was done to a greater extent than what was previously observed with multiple peptides or proteins. Some of the accumulation and effectiveness results, mostly showing a cytotoxic effect on cancer cells, are increased when double functionalization is performed. This suggests that the synergistic effect of dual functionalization could be a promising approach to enhance overall efficacy.

For example, Kuo and Lee, 2016; Kuo and Lee, 2016 and Gandomi et al., 2017 featured dual antibody modification in their studies, each with different objectives. In the first case, Kuo and Lee, 2016 targeted the BBB with both Abs, while in the second, they used one antibody for BBB penetration and another for glioblastoma targeting (Kuo and Lee, 2016). Conversely, Gandomi et al., 2017 combined Abs for precise targeting beyond the BBB, rather than focusing on its initial passage. They used Abs against contactin-2 and neurofascin-2, which are present in the myelin sheath of neurons and are targeted by autoimmune responses associated with multiple sclerosis (Gandomi et al., 2017). Encapsulation alone increased drug passage, while functionalization with these two Abs did not improve BBB permeability. In fact, the functionalization decreased the permeability compared with unfunctionalized nanoparticles. This is not surprising since the inclusion of the Ab was intended for myelin targeting.

In a different combination approach, Marino et al., 2019 designed a vehicle with intrinsic paramagnetic properties and modified it with an antibody against transferrin receptor. They demonstrated the synergistic effect of magnetic stimulation to further enhance drug permeation across the BBB, as showed in Fig. 5-B. Although magnetic stimulation had the most significant contribution enhancing permeation, this disruption method is outside the scope of this review. Thus, we consider this particular study focusing on their evaluation of the potential of the encapsulation and the further enhancement of the anti-transferrin effect. The study showed an increase in permeability compared to the control either with or without magnetic stimulation.

Another relevant observation is the evaluation of the impact of NPs composition in the permeability. Two examples can be found in the studies carried out by Kuo and Lee, 2016; Kuo and Chao, 2016. On one hand, they found that increases in tripalmitin content reduce the NPs ability to cross the BBB (Kuo and Chao, 2016). On the other hand, results

Table 3

Comparative analysis of key study features for antibody-modified lipid nanoparticles to overcome the BBB.

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size;Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Loureiro et al. (2017)	SLNs	254 ± 17 nm; −4.0 ± 0.1 mV	Anti-transferrin: OX26 mAb	i Resveratrol ii Grape extract	<i>In vitro</i> Endothelial cells (derived from umbilical cord) and pericytes	Permeability of the OX26-functionalized SLNs was approximately 4 times higher** than that of the plain SLNs, and about 2 times* higher than the control antibody (Mab LB 509). Permeability calculations were based on fluorescence intensity measured in the abluminal chamber over 2 h period	The amyloid-β aggregation study showed that empty functionalized SLNs promoted aggregation compared to the control. The inclusion of resveratrol and grape extract reduced the accumulation in 26 % and 31 %, respectively.
Wu et al. (2019)	NLCs	14 to 30 nmZeta potential was not reported	Anti-transferrin: OX26 mAb	i Baicalein ii Salvianolic acid	<i>In vivo</i> BALB/c nude Mice, male Sprague Dawley rats, male	In mice, functionalized NLCs was found to be present in the brain region (without quantification), unlike the control groups (unfunctionalized and free drug solutions). In the rat model, functionalization with OX26 resulted in a 1.97-fold* increase in the 24-hour brain AUC of baicalein and a 2.25 increase* in the maximum concentration compared with unfunctionalized NLCs, while unfunctionalized NLCs and a solution of free baicalein yielded comparable results.	Functionalization increased Tmax and decreased t _{1/2} . In an ischemic injury model of oxygen-glucose deprivation, the functionalized NLCs showed a protective activity against damage and exhibited some degree of reperfusion.
Marino et al. (2019)	Lipid paramagnetic nanovectors ²	101.3 ± 1.1 nm; Zeta potential was not reported	Anti-transferrin receptor + Magnetic stimulation (See diagram in Fig. 5)	Temozolomide	<i>In vitro</i> Brain endothelial cells and astrocytes.	Without magnetic stimulation, the anti-transferrin modification improved the NPs crossing approximately 1.9-fold* at 72 h, measure by fluorescence intensity. When applying magnetic stimulation, the concentration of functionalized nanovectors was 2.4 times higher* compared to unfunctionalized nanovectors. In this particular study, magnetic stimulation made the most significant contribution to enhancing permeation.	Regarding the study on glioblastoma multiforme cells, the lowest survival rates (indicating the best anticancer results) were found in the group treated with temozolomide-functionalized nanoparticles with magnetic treatment (7.7 % of healthy cells), followed by the group treated with functionalized nanoparticles without temozolomide and magnetically treated (49.6 %). The other experimental groups showed a higher content of healthy cells (≥96 %). This study includes an evaluation of the internalization pathways of the nanovectors and a proteomic analysis of the synergic pathways triggered by the combined magnetothermal and chemotherapy treatments.
Kuo and Chao (2016)	SLNs	From approximately 79 to 140 nm; Approx. 18 to 35 mV	Anti-Melanotransferrin (MA)	Etoposide (ETP)	<i>In vitro</i> HBMEC-HA	The permeability coefficient of ETP increased by approximately 5.6-fold compared to unfunctionalized NP. The effect was evaluated at	Encapsulation of etoposide reduced tits cytotoxicity on HMBMEC, HA and U87MG, but survival decreased as the antibody content was increased.Changes in (continued on next page)

Table 3 (continued)

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Kuo and Lee (2016)	SLNs	From approximately 110 to 170 nm; Approx. −22 to −32 mV	i Anti-Melanotransferrin (MA) ii Anti-aprotinin (Apr)	Doxorubicin (Dox)	<i>In vitro</i> HBMEC-HA	different MA and lipid concentrations (tripalmitin). The permeability coefficient was determined using etoposide concentration measured with HPLC-UV over 5-hour period. Compared to unfunctionalized SLNs, the inclusion of increasing concentrations of Apr incremented the BBB permeability coefficient up to 8-fold. Further inclusion of MA caused double-functionalized SLNs to show a permeability coefficient about 1.89 higher compared to corresponding SLNs functionalized solely with Apr. Compared to unfunctionalized SLNs, double functionalization caused up to 15-fold increase in permeability. The permeability coefficient was determined using doxorubicin concentration measured with HPLC-UV over 5-hour period.	nanoparticle composition, particularly, an increase in tripalmitin, caused a decrease in the ability to conjugate MA and the loading capacity of etoposide. The lipid proportion of 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (DPPC) also had an impact on permeability. The permeability coefficient of double-functionalized SLNs containing 40 % of DPPC lipid was about 21 % higher compared to those containing 20 % DPPC. Studies on U87MG survival tests showed the best results (higher mortality) for the double-functionalized (40 % DPPC) SLNs.
Kuo and Lee (2016)	SLNs	About approximately 170 to 210 nm; Approx. −17 to −32 mV	i 83–14 monoclonal antibody (8314 Mab) ii Anti-epithelial growth factor receptor (AEGFR)	Etoposide (ETP)	<i>In vitro</i> HBMEC-HA	Compared to unfunctionalized SLNs, surface modification with 8314 Mab-SLNs improved permeability by approximately 5-fold, and 8314Mab-AEGFR-SLNs by about 4.3-fold. The permeability coefficient was determined using etoposide concentration measured with HPLC-UV over 5-hour period.	Double functionalized nanoparticles (8314 Mab-AEGFR-SLNs) reduced U87MG viability to 35 %.
Gandomi et al. (2017)	SLNs	anti-Nfasc, 158 ± 19 nm; −8.71 ± 0.46 mV anti-Cntn2 161.7 ± 13 nm; −8.66 ± 0.41 mV	i Anti-Nfasc ii Anti-Cntn2	i Methylprednisolone (MEP), ii Coumarin	<i>In vivo</i> C57BL mice (induced multiple sclerosis mouse model).	Antibody functionalization did not improve the brain accumulation of coumarin. Furthermore, there were no significant differences between the two antibodies. Encapsulation itself enhanced the brain accumulation of coumarin. Compared to free drug, brain accumulation increased 4-fold** using plain SLNs and 1.6-fold for functionalized SLNs.	The cellular uptake of coumarin by U87MG cells was 6 times higher when it was encapsulated in plain SLNs. Functionalization with Anti-Cntn2 increased cellular uptake by 8-fold, while functionalization with Anti-Nfasc resulted in a 4-fold increase compared to the free drug. Encapsulation of MEP and functionalization (with either antibody) improved the viability of U87MG cells. The authors also tested the partial substitution of lipids within their nanoparticle formulation. They found that cellular uptake could be influenced by the lipid composition of the nanoparticles.

Notes:

Abbreviations: 8314 Mab: 83–14 monoclonal antibody; AEGFR: Anti-epithelial growth factor receptor; Apr: Anti-aprotinin; AUC: Area under the curve; BBB: Blood-brain barrier; Ctn2: Contactin-2; DPPC: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; Dox: Doxorubicin; ETP: Etoposide; HA: Human astrocytes; HBMEC: Human brain microvascular endothelial cells; MA: Anti-Melanotransferrin; ME: Methylprednisolone; Nfasc: Neurofascin; NLCs: Nanostructured lipid carriers; NP: Nanoparticles; SLNs: Solid lipid nanoparticles; $T_{1/2}$: half-life in plasma; Tmax: time to peak measurement.

Reported statistically significant permeability improvements (p value: * < 0.05; ** < 0.01).

† Authors report no statistically significant change in permeability (p value $\geq$ 0.05).

1- The effect of each antibody was evaluated separately, and in combination. Methylprednisolone was encapsulated for the physicochemical evaluations and viability assay, while coumarin-6 was used for cellular uptake and brain uptake. The authors claim that the differences in characteristics between these two formulations were not statistically significant.

suggest that NPs with an increase in DPPC lipid content showed higher BBB permeability (Kuo and Lee, 2016). In another study, the group of (Gandomi et al., 2017) found that the internalization of the nanoparticles and brain uptake is influenced by variations in lipid content. These observations on composition could somehow be correlated with the previously mentioned observation that NLCs showed greater BBB permeability than SLNs.

In terms of physicochemical properties, the range of particle sizes observed in the study shows that different sizes were effective in enhancing drug delivery across the BBB. Regarding the zeta potential values, there is a predominance of negative and low-value charges, consistent with the behavior observed in the previous categories. However, one study demonstrates BBB crossing with zeta potential values of + 35 mV.

Table 3 shows fewer *in vivo* data compared to previous categories, with only two studies employing *in vivo* evaluation models. One study showed positive results (Wu et al., 2019) while the other indicated no improvement in brain accumulation from functionalization (Gandomi et al., 2017), as previously noted. Moreover, neither of these *in vivo* studies provided *in vitro* data, impeding any estimation of IVIVC within this category. Nevertheless, the results show the potential for antibody functionalization strategies and the potential for synergistic effects of antibody combinations.

3.4. Other functionalization strategies on LNPs

In addition to the most common functionalization strategies identified in our systematic review, a subgroup of studies explored alternative moieties for functionalization. These included small molecules, natural products, or biomimetic derivatives, as detailed in Table 4. In this functionalization approach, all the studies reported positive results. However, unlike some values observed in other categories, the maximum functionalization enhancement observed was about a 2.2-fold increase.

This subgroup includes some affordable and regularly used compounds in other pharmaceutical applications. Yet they showed potential for functionalizing LNPs for brain delivery, similar to previous categories. Additionally, this category also includes novel strategies as the exploited by McConnell et al., 2019. Their study, along with the study of Ray et al., 2021 (from the mixing strategies category), represent one of only two publications in this review exploring the use of aptamers as functionalization strategy.

Contrary to what was observed in the previous subsections, studies in this category showed a predominance of *in vivo* evaluation methods (6 out of 8). Three of them not only evaluated brain concentrations but also assessed the effect of functionalization on accumulation in other organs, highlighting the selectivity potential of their strategies. The study conducted by Rajamanickam et al [92] explored the use of a vitamin E derivate to deliver resveratrol-loaded liposomes to the rat brain. While encapsulation significantly increased resveratrol permeability, functionalization marginally increased brain concentrations but significantly reduced accumulation in other organs. In addition, the study by Banerjee et al., 2016 applied functionalization with a somatostatin analog and achieved not only higher brain accumulation but also higher brain tumor accumulation. Moreover, they evaluated the effects of surface

modification on biodistribution patterns.

Another interesting study highlighted in Table 4 is the work by Ma et al., 2020. This study stands out not only for its innovative approach in evaluating various functionalized lipids but also for demonstrating the versatility of their LNPs. Their LNPs are capable of delivering a diverse range of therapeutic agents. From small molecules to antisense oligonucleotides and gene-editing proteins. Each type of cargo had a different formulation and achieved brain accumulation (unquantified). This study stands out as one of the few within this review adopting such a diverse approach and exploiting LNPs potential for gene therapy.

3.5. Mixed combination strategies to functionalize LNPs

Although Tables 1 to 3 already included studies that functionalized LNPs with two peptides (Arora and Singh, 2021), two proteins (Muntoni et al., 2019), or two antibodies (Kuo and Lee, 2016; Kuo and Lee, 2016; Gandomi et al., 2017), those approaches aimed to explore synergies within the same category of functionalization. In contrast, studies listed in Table 5 focus on evaluating LNPs that combine two distinct types of functional categories. These combinations include peptides with natural products, proteins with antibodies, proteins with small molecules, or even biomimetic systems combined with peptides. These strategies show the potential for an inter-functional approach when enhancing NPs delivery. The combinations often include at least one of the functionalization strategies already explored in the previous categories, such as transferrin, ApolipoproteinE and anti-melanotransferrin Ab.

Combination approaches not only facilitate targeting strategies but also enable techniques to increase accumulation by reducing clearance or improving biocompatibility. For instance, Kuo et al integrated their functionalization strategies (proteins and Abs targeting BBB-specific receptors) with tamoxifen. This small molecule has been reported for its capacity to block multidrug resistance-related proteins (Kuo et al., 2021), which are part of the metabolic activity involved in the expulsion of substances that cross the BBB. Similarly, the integration of peptides with biomimetic systems, such as macrophage- and neutrophil-coated nanoparticles, serves as another illustration of the potential for advanced combination strategies. This approach is exemplified in the studies by Han et al., 2021 and Chen et al., 2018.

On the contrary, the experimental design and results of Guo et al., 2020 suggest that adding transferrin to NLCs already functionalized with docosahexaenoic acid might not represent a significant additional enhancement in permeability for their particular formulation. Similarly, Han et al., 2021 observed no substantial improvements from the addition of triphenylphosphine cation (TPP) to macrophage coated SLNs already functionalized with rabies virus glycoprotein peptide. Ray et al., 2021 reported no additional improvements with the addition of penetrating peptides to LNPs already coated by CCR5 aptamer. These examples highlight the complexity and uncertainty of additive effects, indicating that multiple functionalization does not necessarily imply better permeability outcomes. However, other variables might be influencing the experimental results. For example, in the study from Guo et al., 2020, their particular results showed that that highest permeation enhancement seems to shift from double to single functionalization from day one to day three, as illustrated in Fig. 6.

Table 4

Comparative analysis of key study features for other functionalization strategies for lipid nanoparticles to overcome the BBB.

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size;Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Banerjee et al. (2016)	SLNs	178 ± 9.4 nm; −17.4 ± 1.7 mV	Tyr-3-octreotide	Paclitaxel	<i>In vivo</i> Sprague Dawley Rats	Functionalization led to an approximate 1.29-fold increase in brain accumulation and around a 1.59-fold rise in brain tumor accumulation. Brain accumulation was calculated using radioactivity measurements in tissue samples observed up to 6 h post-administration.	The authors' data provide a solid basis for discerning the effects of nanoparticle functionalization on organ-specific accumulation. The formulation showed significantly higher anti-tumor efficacy and improved survival rates, compared to un-functionalized nanoparticles, free paclitaxel and saline control, in that order.
Vijayakumar et al. (2016)	Liposomes	64.5 ± 5.56 nm; −1.05 ± 1.12 mV	TPGS ¹	Resveratrol	<i>In vivo</i> Charles Foster rats	Encapsulation of resveratrol in plain liposomes increased brain concentration by 8.58-fold*, while encapsulation in functionalized liposomes increased it by 10.95 times* (functionalization only increased concentrations by about 1.27-fold *). Brain concentration of resveratrol was measured with HPLC-UV on tissue samples of animals scarified 90 min after administration	In all organs except the brain, functionalization reduced resveratrol accumulation compared to plain liposomes. The authors also proved the biocompatibility of the formulation in haemolysis and platelet aggregation studies.
Ma et al. (2020)	Lipid nanoparticles ³	About approximately 170 to 180 nm; About approximately 40 mV	Neurotransmitter –derived synthetic lipids(tryptamine)	i Amphotericin B ii Antisense oligonucleotides iii Genome editing fusion protein	<i>In vivo</i> BALB/C mice (female)	Authors described that the incorporation of the neurotransmitter–derived synthetic lipids led to brain accumulation of a fluorescent dye in otherwise impermeable lipid nanoparticles. They compared the relative intensity of three different neurotransmitter–derived synthetic lipids and found brain accumulation only with the lipid modified with dimethyltryptamine.	The authors combined the neurotransmitter with lipid tails with different carbon lengths. They found that the relative intensity of brain accumulation was different for each lipid tail. The authors used their formulation to successfully deliver small-molecule drugs, nucleic acids and genome—editing proteins to the brain after vein injection. Each formulation used a different base nanoparticle formulation but used the same neurotransmitter—derived synthetic lipids.
Wu et al. (2023)	Lipid nanocapsules ⁴	31.2 ± 0.8 nm; −5.2 ± 0.26 mV	Menthol	Verbascoside	<i>In vitro</i> hBMECs	Compared to unfunctionalized nanoparticles, the incorporation of menthol increased the transportation ratio of the BBB model by 1.29-fold (at 0.1 µg/mL) and 2.20-fold * (at 1 µg/mL). Compared to free drug the increase was up to 3.84-fold*.	The encapsulated therapy combining verbascoside with menthol decoration demonstrated a neuroprotective effect in a neurotoxic cell model. It effectively reduced reactive oxygen species, apoptotic mediators, and the aggregation of Aβ peptides, showing promising potential for research into protein tau phosphorylation in the treatment of Alzheimer's disease.
Zwain et al. (2023)	NLCs	gamma-linolenic acid, 157.36 ± 1.53 nm; −19.13 ± 0.20 mV alpha-linolenic	Gamma-linolenic acid and Alpha-linolenic acid	Docetaxel	<i>In vitro</i> HBMEC, HBVP and HA	After 6 h of administration in the <i>in vitro</i> model, both functionalized nanoparticles showed a fluorescence rate 2-	The authors also demonstrated enhanced permeability in a blood–brain tumor barrier model. Their

(continued on next page)

Table 4 (continued)

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size;Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
		acid, 155 ± 0.10 nm; −16.03 ± 1.20 mV				fold higher than that of the unfunctionalized nanoparticles.	results showed increased absorption of the functionalized NLCs, which preferentially targeted glioblastoma cells over healthy cells, thereby amplifying the induced toxicity of docetaxel.
Patra et al. (2024)	SLN	140 ± 30 nm; −14 ± 5 mV	S-(−)-γ-amino-α-hydroxybutyric acid (GAHBA) derived lipids	Chlorambucil	<i>In vivo</i> female C57BL/6 mice	The authors evaluated the biodistribution of radiolabeled SLNs and observed brain uptake. This evaluation did not provide a comparison with non-modified SLNs	Authors conducted a docking study to investigate the interactions between γ-aminobutyric acid (GABA) and S-(−)-γ-amino-α-hydroxybutyric acid (GAHBA) with the GABA receptor. Additionally, they evaluate the transfection efficiency on U87MG and human prostate cancer PC3 cell lines.
Wu et al. (2024)	Lipid nanoparticles ³	78.7 ± 0.79 nm; 7.9 ± 1.24 mV	Borneol	Exenatide	<i>In vitro</i> bEnd.3 <i>In vivo</i> male C57BL/6 mice	Flow cytometry results showed higher uptake of borneol-modified LNPs compared to plain LNPs, in SH-SY5Y cells in the abluminal chamber. <i>In vivo</i> results showed approximately a 2-fold** increase in brain accumulation, measured by fluorescence intensity 4 h post-administration.	The authors propose that their borneol-modified LNPs enhance permeability by translocating tight junction proteins on bEnd.3 cells. The also assessed safety and biocompatibility of their LNPs, as well as its effects on motor symptoms relief, dopaminergic neuron restoration, and amyloid protein production in a Parkinson's disease mouse model.
McConnell et al. (2019)	Liposomes	57 ± 0.79 nm; Zeta potential was not reported	Transferrin receptor aptamer	Dopamine aptamer	<i>In vivo</i> male CD1 mice	Fluorescence microscopy revealed enhanced brain delivery from transferrin aptamer functionalization, evidenced by distinct fluorescence distribution (not quantified).	Prior to this, the authors screened various aptamers to identify the most effective for liposome functionalization. Additionally, they conducted behavioral tests to assess the impact on neural dopamine levels and confirmed elevated concentration of neural dopamine, and yet demonstrating that chronic systemic administration of their formulation did not produce adverse neurobehavioral or neurodegenerative effects.

Notes:

Abbreviations: GAHBA: S-(−)-γ-amino-α-hydroxybutyric acid; HA: Human astrocytes; HBMECs: Human brain microvascular endothelial cells; HBVP: Human brain vascular pericytes; NLCs: Nanostructured lipid carriers; SLNs: Solid lipid nanoparticles; TPGS: D-α-Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate.

Reported statistically significant permeability improvements (p value: * < 0.05).

1- D-α-Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate is a PEGylated derivate of vitamin E.

2- The authors conducted their research using a mouse model with induced traumatic brain injury.

3- Not categorized, possibly SLNs.

4- Reverse micelles encapsulated into a lipid nanoparticle, possibly with an structure similar to NLCs.

Table 5

Comparative study of studies of lipid nanoparticles using mixed functionalization methods to overcome the BBB.

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size;Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Basso et al. (2020)	Ultra small NLCs	124.0 ± 0.2 nm; 7.5 ± 0.4 mV	Hyaluronic acid conjugated with: i H7k(R2)2 peptide ii Folic acid	i Curcumin ii Atorvastatin	<i>In vivo</i> Nude mice (male)	For atorvastatin, encapsulation alone led to a 9.32-fold increase in the brain's AUC. Double functionalization also resulted in higher AUC compared to the free drug (2.94-fold), but functionalization alone led to a decrease compared to plain NLCs (0.315-fold). As for curcumin, encapsulation alone reduced the brain AUC (0.33-fold) but double functionalization led to a 5.97-fold increase compared to the free drug and a 27.69-fold compared to plain NLCs. Calculation was performed by quantification of curcumin and atorvastatin in tissue samples by HPLC-UV	The authors assessed organ-specific selectivity using the Drug Selectivity Index (DSI) and compared encapsulated versus non-encapsulated administration with the Drug Targeting Index (DTI), highlighting the formulations' efficacy in minimizing drug accumulation in organs like the liver and spleen. Additionally, evaluations of cell viability, uptake, and pathways, alongside anti-tumour activity in a mouse model, comparing functionalized nanoparticles with non-encapsulated drugs and saline controls, demonstrated that functionalized nanoparticles more effectively hindered glioblastoma progression and offered a safer profile
Li et al. (2016)	Liposomes	78.87 ± 2.29 nm; −15.8 ± 0.26 mV	Glutamate-TPGS ¹	Docetaxel	<i>In vivo</i> Male Kunming mice	The modification with only TPGS, and TPGS combined with glutamate, enhanced the brain accumulation of liposomes encapsulating a fluorescence dye. However, this accumulation was not quantified.	The authors demonstrate the targeting efficiency to Large Amino Acid Transporter 1 (LAT1), present in the BBB and overexpressed in some types of cancer.
Kuo et al. (2022)	SLNs	About 200 nm; About −28 and −38 mV	Folic Acid and Transferrin targeting peptide (Tf)	i BV6 ii GDC0152 ¹	<i>In vitro</i> HBMECs, HAs and HBVPs	The inclusion of Tf on the surface of the SLNs increased the permeability of BV6 and GDC0152 by about 1.7-fold* compared to unfunctionalized SLNs, and more than 2.5-fold** compared to free drugs. Permeability calculations were based on drug concentrations measured in the abluminal chamber over 4-hour period	Through immunofluorescence staining, flow cytometry, and Western blot analysis, the effectiveness of folic acid and transferrin-modified SLNs encapsulating BV6 and GDC01521 was demonstrated in the downregulation of apoptosis inhibitors (cIAP-1, XIAP), which act on caspase 3. This downregulation consequently led to an upregulation of caspase 3 content.
Guo et al. (2020)	NLCs ²	93.02 ± 4.33 nm Between −30 and −35 mV	Docosahexaenoic acid (DHA) and Transferrin targeting peptide (Tf)	Darunavir	<i>In vitro</i> hCMEC/d3 <i>In vivo</i> ICR mice (both sexes)	<i>In vitro</i> studies highlighted the significant role of DHA in enhancing cellular barrier penetration by nanoARVs, while the presence of Tf decoration did not notably affect this outcome. After 6 h, permeation compared to the free drug increased to 3.16** with 5 % DHA, 3.21** with 5 % DHA-Tf, 7.67** with 15 % DHA, and 8.99** with 15 % DHA-Tf.	After comparing results from empty nanoparticles (both with and without functionalization), free drug, and functionalized drug-loaded nanoparticles, the authors observed enhanced anti-HIV activity in the latter, evaluated in a 293 T cell model expressing the p24 HIV capsid protein. The authors also demonstrated the stability and biocompatibility of their preparations.

(continued on next page)

Table 5 (continued)

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Kuo and Hsu (2017)	SLNs	Between 70 and 190 nm Between -15 and 42 mV	Anti-melanotransferrin and ApolipoproteinE	Doxorubicin	<i>In vitro</i> HBMEC/HA	<i>In vivo</i> studies indicated an improvement in darunavir brain accumulation attributable to both DHA and Tf over a 3-day evaluation period. On day one, the greatest enhancement compared to free drug was observed in nanocarriers including both DHA and Tf (5.93)*, and by day three, the highest increase was seen in only DHA-modified carriers (4.41)**. Refer to Fig. 6 for more details. Darunavir concentrations in the abluminal chamber and tissue samples were measured using liquid chromatography- mass spectrometry. Compared to plain nanoparticles, the inclusion of anti-melanotransferrin increased the permeability of the doxorubicin up to 1.5-fold. For the case of the double-functionalized nanoparticles, the increase was up to 4-fold. Permeability calculations were based on drug concentrations measured in the abluminal chamber over 5-hour period	Antiproliferative assays on U87MG cells demonstrated enhanced efficiency due to functionalization. The highest efficacy was observed in doubly modified nanoparticles, followed by (in this order): anti-melanotransferrin, plain nanoparticles, and free drug, showing lesser effects.
Han et al. (2021)	SLNs (Macrophage membrane-coated)	123.19 ± 0.57 nm; 19.13 ± 0.33 mV	Macrophage membrane-coated; RVG and TPP peptides	Genistein	<i>In vitro</i> bEnd.3, HT22 and astrocytes <i>In vivo</i> SD rats, C57BL/6J mice and APP/PS1 mice	Results from flow cytometry on HT22 cells after crossing the BBB model showed an increase of 11.56-fold* for the macrophage membrane-coated SLNs with both peptides. Macrophage membrane-coated SLNs with RVG showed 10.63-fold*, the macrophage membrane-coated SLNs with TPP 3.85-fold), and the macrophage membrane-coated with no peptides 1.85-fold. All results obtained after 12 h of incubation and compared to free fluorescent dye. The <i>in vivo</i> results on SD rats showed an accumulation in brain tissue up to 8-fold* for both the fully functionalized SLNs and the macrophage membrane-coated SLNs with RVG peptide. The macrophage membrane-coated SLNs with TPP showed about a 2-fold increase, all compared to the macrophage membrane-coated SLNs with no peptides. Fluorescent signals from	The authors conducted preliminary safety tests on HT22 neurons and assessed how peptide incorporation reduced the ability of macrophage membrane-coated SLNs to evade the reticuloendothelial system and prolong circulation times. <i>In vitro</i> studies on HT22 neuronal cells demonstrated enhanced anti-apoptotic effects and reduced mitochondrial reactive oxygen species with the fully functionalized SLNs. <i>In vivo</i> , Morris water maze tests on APP/PS1 transgenic mice revealed improved behavioral outcomes for the fully functionalized SLNs, indicating potential as an effective treatment for slowing Alzheimer's disease progression. These studies also showed a reduction in neuroinflammation, and a decrease in markers of oxidative stress and Alzheimer's disease progression.

(continued on next page)

Table 5 (continued)

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size;Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Chen et al. (2018)	SLNs (neutrophil-SLNs co-vehicle).	Between 30 and 60 nm; 12.6 mV	Neutrophil-coated PGP (N-Acetyl-Pro-Gly-Pro)	Baicalein	<i>In vivo</i> Tissue distribution in rats	brain homogenates were analyzed to obtain the accumulation results. After 7 days of administration, the fluorescence intensity in the basolateral amygdala were 4.6 times higher for the neutrophil-coated SLNs decorated also with PGP, compared to the neutrophil co-vehicle without peptide.	The binding capacity and stability of PGP-SLNs to neutrophils demonstrated high affinity. The formulations exhibited <i>in vitro</i> antioxidative effects and enhanced baicalein efficacy due to encapsulation in SLNs. Functionalized NPs showed a greater antidepressant effect in rat behavioral models (reduced immobility and increased swimming times) than unfunctionalized SLNs, with both nanoparticle formulations outperforming the free drug in antidepressant efficacy.
Hernando et al. (2022)	NLCs	264.1 ± 16.0 nm; 20.5 ± 0.8 mV	Chitosan and Trans-activating transcriptional activator	Glial cell-derived neurotrophic factor, or Vascular endothelial growth factor	<i>In vitro</i> hiPSC	Crossing of the double-functionalized NLCs was detectable by confocal microscopy, whereas the chitosan-modified alone was not detectable across the BBB model, after 2 h of incubation.	In a microglial cell line model with an inflammation inducer, the formulation demonstrated antioxidative stress properties and effectively reduced the inflammatory state.
Kuo and Cheng (2016)	SLNs	About approximately 105 to 180 nm; About approximately 17 to 38 mV	i Lactoferrin (Lf) ii Tamoxifen (TX) ¹	Carmustine	<i>In vitro</i> HBMECs/HAs cells	Lactoferrin and tamoxifen double-functionalized SLNs increased permeability coefficient by approximately 8.5-fold* compared to unfunctionalized SLNs. Tamoxifen alone improved permeability by 4-fold. Results on SLNs modified only with lactoferrin were not reported. Permeability coefficient were calculated based on carmustine concentrations measured in the abluminal chamber over 5-hour period	Double-functionalized SLNs decreased viability of U87MG cells by almost 75 %. SLNs functionalized only with tamoxifen were the second most effective (approximately 50 %), followed by SLNs functionalized only with lactoferrin (approximately 30 %). Unfunctionalized SLNs had an effect comparable to the control.
Kuo and Wang (2017)	SLNs	About approximately 165 to 225 nm; About approximately 6 to 12.5 mV	i Lactoferrin ii Wheat germ agglutinin (WGA)	Etoposide	<i>In vitro</i> HBMECs/HAs cells	Compared with unfunctionalized SLNs, the permeability index of etoposide increased by 3-fold with the SLNs modified with only Lf. The inclusion of WGA (double functionalization) increased the permeability by 5.5-fold. Permeability calculations were based on etoposide measurements in the abluminal chamber over a 5-hour period.	SLNs containing etoposide and co-functionalized with Lf and WGA reduced the viability of U87MG cells (mortality approximately 30 %). Modification with only Lf caused the mortality of approximately 25 % of cells, while unfunctionalized SLNs had an effect on about 20 %.
Kuo and Wang (2016)	SLNs	From approximately 150 to 280 nm; About approximately 12 to 27 mV	i Anti-Melanotransferrin (MA) ii Tamoxifen (TX) ¹	Etoposide (ETP)	<i>In vitro</i> HBMEC-HA	Double functionalization (MA and tamoxifen) increased the etoposide permeability coefficient by almost 2-fold* compared to functionalization with tamoxifen only. Controls did not include plain SLNs. Permeability calculations	Based on calcein-AM clearance studies, the authors showed that functionalization with melanotransferrin did not affect the tamoxifen capacity to decrease the activity of multidrug resistance-related proteins. The functionalized SLNs were effective in treating U87GM cancer cells,

(continued on next page)

Table 5 (continued)

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size;Zeta potential	Functionalization	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Ray et al. (2021)	Lipid nanoparticles ³	Specific reported values range between: 54.2 ± and 69.2 ± nm; Between -11 ± and -2.9 ± mV	Aptamers: GP160 and CCR5 Peptides T7 and Tat	None	In vitro hCMEC/D3	were based on etoposide measurements in the abluminal chamber over a 5-hour period. Authors found that CCR5 aptamer facilitated passage through the BBB model, whereas the gp160 aptamer did not. They also noted that incorporating cell-penetrating peptides, Tat and T7, did not enhance BBB penetration beyond that achieved with aptamer-loaded LNPs alone. In this study, evaluation were performed by seeding different type of target cells in the abluminal chamber, and evaluating fluorescent intensity after 24 h of incubation with the NPs.	reducing their survival to approximately 25 %. The authors also found that functionalization with CCR5 aptamer also facilitates the uptake of the LNPs into CCR5-expressing cells. Additionally, they demonstrate the low immunogenic and low toxic profiles of their formulation.

Notes:

Abbreviations: AUC: Area under the curve; BBB: Blood-brain barrier; Bend.3: Brain endothelial cells derived from mice; CCR5: RNA aptamer specific for the HIV-1 entry coreceptor C-C chemokine receptor type 5; DHA: Docosahexaenoic acid; DSI: Drug selectivity index; DTI: Drug Targeting Index; ETP: Etoposide; GP160: RNA aptamer specific for the HIV-1 envelope protein gp160; HA: Human astrocytes; HBMECs: Human brain microvascular endothelial cells; HBVP: Human brain vascular pericytes; HBMEC/D3: Human brain microvascular endothelial cells; hiPSC: Induced pluripotent stem cell; HIV: Human immunodeficiency virus; LAT1: Large amino acid transporter 1; LNPs: Lipid nanoparticles; MA: Anti-melanotransferrin; NLC: Nanostructured lipid carriers; PGP: N-Acetyl-Pro-Gly-Pro; RVG: rabies virus glycoprotein (peptide); SLNs: Solid lipid nanoparticles; TA: Tamoxifen; Tf: Transferrin targeting peptide; TPGS: D-α-Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate; TPP: triphenylphosphine cation; WGA: Wheat germ agglutinin.

Reported statistically significant permeability improvements (p value: * < 0.05; ** < 0.01).

1- Antagonists of apoptosis inhibitor proteins that can induce an apoptotic signaling pathway against tumor cells.

2- Authors identify their lipid nanocarriers as “NanoARV” because of their anti-retroviral application.

3- Not categorized, possibly corresponds to NLC.

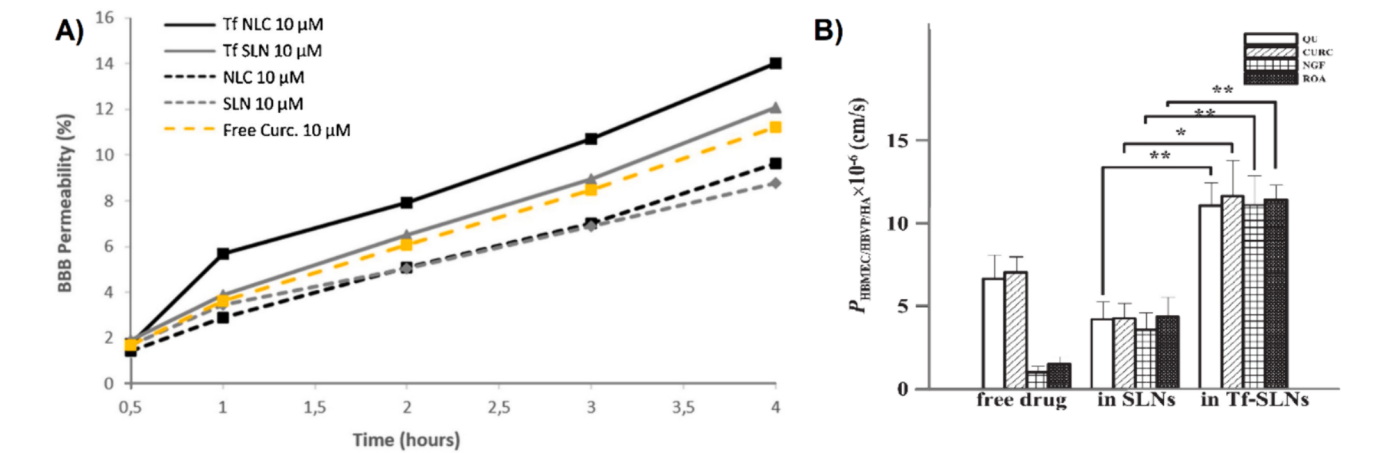


Fig. 4. Impact of nanoparticle encapsulation, peptide inclusion, and nanoparticle and drug nature in permeability across BBB cellular models. A) Curcumin encapsulation in SLNs and NLCs led to reduced BBB permeability, but the Inclusion of transferrin peptide resulted in increased permeability, especially for NLCs. Permeability for modified SLNs and free drug (Curc) were comparable. B) Encapsulation in SLNs reduced the permeability of free quercetin (QU) and curcumin (CURC), but increased the permeability of nerve growth factor (NGF) and Rosmarinic acid (ROA), bringing all four drugs to comparable levels. Further transferrin inclusion significantly increased the permeability of all four drugs; *p value < 0.05, **p value < 0.05. Reprinted with permission from Neves et al., 2021 and Kuo et al., 2020.

Regarding the employed evaluation methods, 5 out of 12 studies conducted *in vivo* assessments, with two integrating *in vitro* analyses as well (Han et al., 2021; Guo et al., 2020). In the study from Guo et al., 2020, the conclusions drawn from both *in vitro* and *in vivo* models regarding the significance of the second functionalization (addition of

transferrin peptide) were similar. However, in the study from Han et al., 2021, the interpretation regarding the impact of adding one versus two peptides to the macrophage membrane-coated SLNs varied depending on whether *in vitro* or *in vivo* results were considered. Basso et al., 2020 present another instance of the divergent correlation between *in vitro*

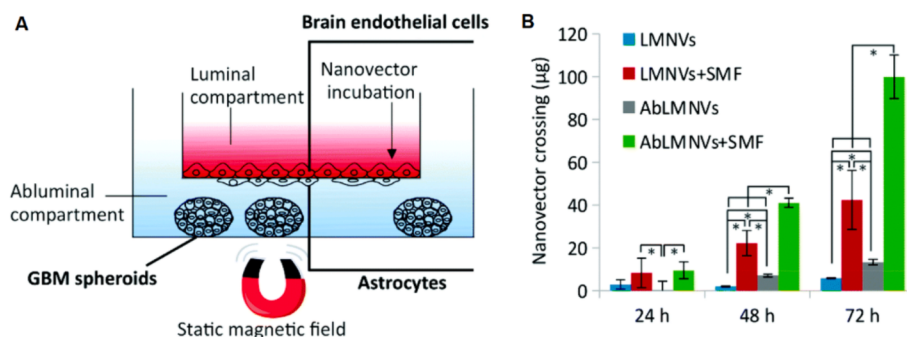


Fig. 5. Synergistic effect of anti-melanotransferrin antibody functionalization on supramagnetic nanoparticles. A) Diagram of the cellular model including magnetic stimulation that forced the NPs to cross the cellular layer, and B) Nanoparticle crossing predominantly affected by magnetic stimulation. LMNVs = lipid magnetic nanovectors; SMF=static magnetic field; Ab = antibody- modified nanovector. * p value < 0.05. Figure adapted from (Muntoni et al., 2019) with permission from the Royal Society of Chemistry ©.

and *in vivo* findings. Despite relying solely on an *in vivo* model for BBB permeation, their study assessed anti-tumor efficacy both *in vivo* and *in vitro*. The research revealed weaker *in vitro* anti-tumor activity compared to *in vivo* results. Their study also exploited *in vivo* evaluations to investigate functionalization effects on organ accumulation. Notably, developing two indicators: the Drug Selectivity Index (DSI) and Drug Targeting Index (DTI), offering valuable insights into organ-specific selectivity evaluations (Basso et al., 2020). The evaluation included two different drugs, and the permeability, permeability enhancement, DSI and DTI values were different for each drug.

As previously stated, multiple functionalization did not necessarily imply better permeability. However, it is noteworthy that some of the more pronounced differences in permeabilization can be found within this category. For instance, Basso et al., 2020 found a 27.69-fold increase in *in vivo* brain concentrations for curcumin. Han et al. (2021) observed an 8-fold increase. Additionally, studies by Kuo et al in the protein (Kuo et al., 2021) and antibodies categories (Kuo and Lee, 2016) show that double-functionalized NPs may have significantly higher permeability than single-functionalized or plain NPs.

3.6. Non-modified LNPs, or modified with regularly used materials

As outlined earlier, NPs can cross the BBB even without specialized functionalization (Neves et al., 2021; Arduino et al., 2020; Pucci et al., 2020). This observation is supported by results from earlier sections, where the impact of functionalization was often evaluated in comparison to the permeability of unmodified LNPs. Consequently, in our systematic review, we also found studies that reported on LNPs formulations without any functionalization methods (Khan et al., 2020; Liu et al., 2022; Kumar et al., 2016; Gadgil et al., 2018; Ghasemian et al., 2017; Nasir et al., 2023; Rubab et al., 2021; Arduino et al., 2020; Zwain et al., 2021; Chen et al., 2017; Rojekar et al., 2021; Huang et al., 2020; Gomes et al., 2016; Makhdoomi et al., 2022; Mante et al., 2021; He et al., 2019; Ebrahimi et al., 2022; Marinelli et al., 2023; Pandian et al., 2021) and yet showed promising results for brain delivery. Additionally, we found research focusing on formulations that primarily utilize surfactants (Pavlov et al., 2020; Lahkar and Kumar, 2018; Graverini et al., 2018; Esposito et al., 2017; Meng et al., 2016) and PEGylation (Buzuyurova et al., 2020; Vijayakumar et al., 2016) as their chosen strategies for functionalization. However, since the addition of surfactants and PEGylation are regularly adopted strategies in the manufacturing of different types of LNPs, we categorize these kind of functionalization strategies into the same category as non-modified or modified with regularly used materials, for the context of this review.

Table S1 and Figure S1 provide more details on key features of the studies included in this passive targeting category. These results illustrate that even these regular modifications can significantly improve brain drug distribution. Moreover, some studies evaluate and find positive effects on therapeutic efficacy and safety profiles. For example, studies showed therapeutic potential in anxiolytic (Khan et al., 2020; Rubab et al., 2021), antitumor (He et al., 2019; Nasir et al., 2023), and antioxidant (Marinelli et al., 2023; Kumar et al., 2016) activity evaluations, as well as positive results in seizure (Mante et al., 2021), cognitive impairment (Makhdoomi et al., 2022), and oxidative damage (Huang et al., 2020) models. In accordance with previous observations, NLCs showed higher BBB penetration compared to SLNs when those alternatives were evaluated in the same study (Kumar et al., 2016; Ghasemian et al., 2017).

4. Cross-category evaluation of permeation enhancement

As stated in Section 2, the results from 32 studies were collected for data analysis. These studies provided quantification data that allowed determination of the extent to which permeability increased due to functionalization effects. Due to comparisons of different combinations or combinations of *in vivo* and *in vitro* results in some studies, these 42 studies yielded 91 different ratios for data analysis. Fig. 7 shows the data distribution and variable impacts observed.

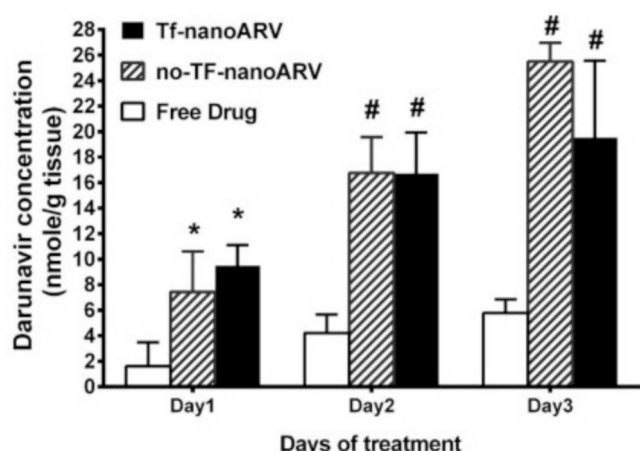


Fig. 6. Temporal impact of single and double functionalization on darunavir brain concentrations. The reported results show darunavir *in vivo* brain concentrations after the administration of the free drug, the drug encapsulated in nanoARV (NLCs functionalized with docosahexaenoic acid), and the nanoARV with additional transferrin functionalization. The more pronounced effect of one nanosystem over the other depends on the day of evaluation; * p value < 0.05 vs free drug; # p value < 0.01 vs free drug. Reprinted with permission from Guo et al., 2020.

To further elucidate these findings, we conducted a principal component analysis (PCA) with a covariance matrix, detailed in the [Supplementary Information](#) (Figures S2 to S4). Insights from the first two components, explaining 98.1 % of the data variability, allowed identification of a significant impact on BBB permeability for particle size, type of lipid nanoparticle and category of functionalization.

Conversely, the PCA revealed that zeta potential does not significantly contribute to explaining data variability for the included studies. This suggests its lesser role in the predictive modeling of permeability enhancement. Subsequent classification through CART® analysis ([Supplementary Figures S5 and S6](#)) indicated that particle size was the predominant predictor for this particular set of observations. This was

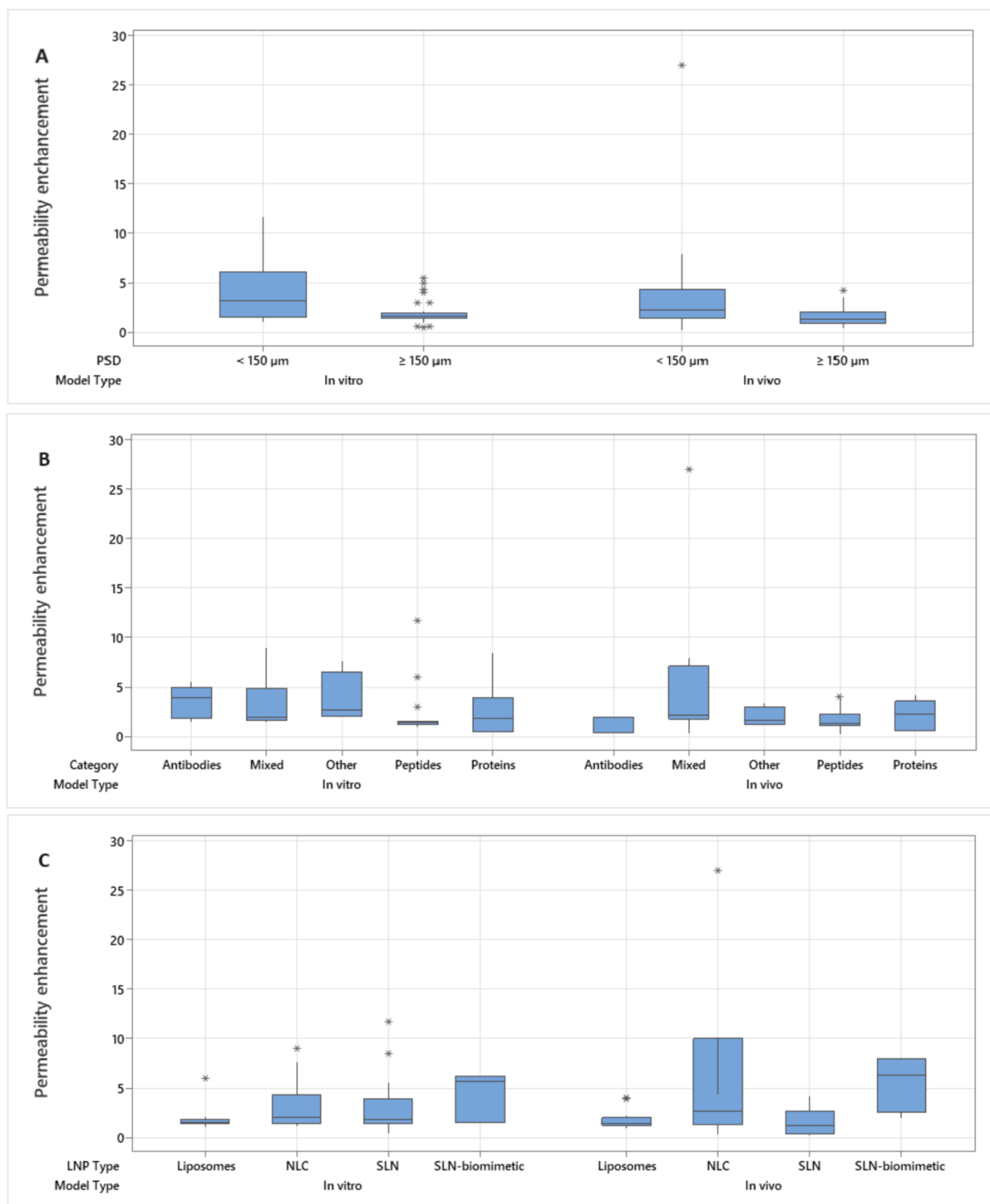


Fig. 7. Cross-category impact on permeation enhancement across the BBB. Analysis by particle size (A), functionalization category (B) and the type of lipid nanoparticles (C) from 42 studies that allowed permeability enhancement. Variable significance is supported through principal component analysis and CART® classification, complemented by main effects and variance analyses detailed in [Supplementary Information](#) (Figures S2-S8).

followed by the functionalization category and the type of lipid nanoparticle. Figure S7 and the corresponding analysis of variance validated the categorization of particle sizes based on different response patterns in permeation enhancement ratios. Moreover, the main effects analysis shown in Figure S8 confirmed the significant effects of particle size, functionalization category and the type of lipid nanoparticle on the evaluated permeation enhancement ratios.

5. Discussion

Across all categories, the functionalization of LNPs consistently improved their ability to cross the BBB. This enhancement improved drug delivery to the brain while proving their biocompatibility. These strategies emerge as potential tools to overcome the restrictive properties of the BBB. The variety of therapeutic agents applied in the observed studies highlights the adaptability of LNPs as versatile carriers. Regarding the encapsulated drugs, our findings reveal a predominance of natural extracts and small molecules, with a surprisingly limited application to nucleic acid brain delivery. However, examples such as the protein expression observed in the studies by Arora and Singh, 2021; Arora et al., 2020 and Ma et al., 2020, or the encapsulation of siRNA and mRNA by Tang et al., 2024 and Bi et al., 2023 underscore the high potential of this delivery systems in gene and RNA therapy.

This limited use within the included studies contrasts with other development areas of nucleic acid delivery, where LNPs are at the forefront of clinical innovation. This might be due to a relatively unexplored potential for nanoparticle brain delivery and active targeting. This predominance of therapeutic evaluations represents an opportunity for innovative research in gene therapies and nucleic acid approaches to brain drug delivery. Despite these observations, the results also showed versatility in terms of therapeutic objectives, from chemotherapy agents to anti-inflammatory drugs.

To interpret the permeability enhancement ratios derived from various studies, it is important to consider that each ratio has its own confidence intervals. These intervals arise from the inherent data uncertainty of each reported result. Such intervals suggest caution in interpreting minor differences, as they may not be statistically significant. In fact, only a portion of the studies included in this review explicitly report the statistical significance of their permeability comparisons, as detailed in Tables 1–5 and S1. Regardless, a comprehensive analysis of collective data trends across studies provides a robust foundation for understanding the overall impact of LNPs functionalization on BBB permeability. This analysis also helps in identifying meaningful enhancements in drug delivery efficiency through LNPs.

Fig. 7 (and Figures S2–S8) shows particle size, functionalization category and type of LNPs as the main descriptors of patterns in permeability enhancement across the studies included in this review. By identifying the relative importance of these three factors, our analysis suggests that the formulation and design of the base nanoparticle (size and composition) are as important as the functionalization studies.

Regarding the first parameter (particle size), our findings show that LNPs smaller than 150 nm exhibit greater potential for permeation enhancement (Fig. 7-A). This aligns with the generally accepted claim that smaller particles are more capable of crossing biological barriers (Mishra et al., 2023; Correia et al., 2022; Jia et al., 2020). This may be due to the physical restrictions of larger particles and the higher surface area to volume ratio of smaller particles, allowing for closer interactions. In addition, our findings suggest that smaller particles are also more sensitive to permeability enhancement due to functionalization. The observed results lead us to define a size limit of 150 nm as “smaller nanoparticles” for the data included. Optimizing particle size is crucial for effective drug delivery systems targeting the CNS and reinforces the importance of meticulous nanoparticle design. This emphasizes the need for precision in engineering lipid nanoparticle systems to maximize their brain delivery capabilities.

The second variable aligns with the main objective of this review.

Indeed, the cross-category results indicate that the selection of different functionalization strategies might affect the outcome in achieving brain transportation. However, the interpretation requires careful consideration of the type of BBB model applied. For example, the efficacy of antibodies and other strategies drops when comparing *in vitro* and *in vivo* results. Contrary, peptides, proteins and mixed strategies showed higher ratios for the studies reporting *in vivo* data (Fig. 7-B). The results for mixed functionalization strategies stand out due to their higher permeation enhancement values. This suggests that synergistic effects between different functionalization agents can lead to more efficient BBB penetration. While this synergy probably combines multiple mechanisms of transportation to optimize brain delivery, it might be associated with increased complexity and cost implications. Conversely, a closer examination of the data from Table 5 reveals that the highest permeability is not always achieved with dual-functionalized nanoparticles. For example, in the study from Han et al., 2021, the inclusion of TPP to RVG functionalization did not significantly enhance permeability beyond that achieved with the comparison to RVG alone. Similarly, in the study from Guo et al., 2020, the further addition of transferrin to DHA functionalization did not significantly impact permeability. This was especially the case in the presence of 5 % DHA. Such observations suggest that while the concept of combining functionalization agents is promising, synergistic benefits are unpredictable and do not always materialize. This can potentially complicate the design and increasing costs without commensurate gains in performance. This observation calls for a judicious balance between the complexity of functionalization strategies and their practical benefits.

The third variable with more relevance in describing the collected data is the type of nanoparticle (Fig. 7-C). One of the clearest and most consistent observations is the influence of the composition of the LNPs on both the base permeation and in the permeation enhancement. Notably, differences due to the nature of the lipid nanoparticle (NLCs or SLNs) were evident in every study included in our review. This was observed where both types were evaluated applying the same functionalization strategy, and evaluation model (presumably, under the most comparable conditions possible). Consistently, NLCs showed higher based permeability and greater permeation enhancement after functionalization (Neves et al., 2021; Pinheiro et al., 2020; Pinheiro et al., 2020; Kumar et al., 2016; Ghasemian et al., 2017). Other studies also reported results suggesting that lipid selection and quantity play a key role in determining BBB permeation (Reginald-Opapa et al., 2022; Kuo and Lee, 2016; Gandomi et al., 2017; Kuo and Chao, 2016). This might be due to changes in the physicochemical properties of the LNPs. These changes affect the affinity and fusogenic properties when interacting to ECs in the BBB. The other category with higher permeation enhancement results is the biomimetic systems, which mimics blood cells. Their similarity to endogenous entities might explain their higher permeability, probably due to different mechanisms that other types of LNPs. This should carefully consider when selecting and applying functionalization strategies.

The impact of variables on the *in vivo* results in Fig. 7 appears clearer and showed more significance. In contrast, the differences on the *in vitro* results for functionalization category and type of lipid nanoparticles are less pronounced between categories. Thus, conclusions might be more affected by the confidence intervals above-mentioned. Additionally, the comparability of the results could be restricted by the remarkable heterogeneity observed. The reviewed studies collectively exposed several factors with an apparent influence beyond mere functionalization. Our analysis revealed substantial heterogeneity in experimental approaches and selected variables across studies, complicating direct comparisons. This also introduces added complexity to the analysis and design of LNPs systems for brain delivery. To address this challenge, we categorize the sources of variability into two predominant factors: nanoparticle composition and evaluation methodologies. Each sub-section aims to highlight the implications of these variables on the performance and assessment of LNPs from the observations drawn from different studies.

5.1. Nanoparticle composition variables as a source of variability

Differences due to the type of LNPs could be partially attributed to variations in NPs composition. Additionally, other changes related to composition could affect comparability. One example was found in the studies that included the evaluation of different cargoes using the same formulations. Their results showed that the drug itself also affects the effect of encapsulation and functionalization on BBB permeability. For example, the study from Basso et al., 2020 showed particularly different effects for the encapsulation and the functionalization of Atorvastatin and Curcumin, also affected by the comparison point (see Section 5.2.2 for more details). Kuo et al., 2021 found that their functionalization strategy improved the permeability of epigallocatechin gallate, but reduced it for resveratrol, and (Kuo et al., 2020) also observed differences according to the drug base permeability (Fig. 4-B). Collectively, these results strongly suggest that the effect from one drug cannot be extrapolated to other drugs. The relative impact of a given functionalization strategy should be assessed based on the same formulation and the same drug.

The quantity of functionalization moiety incorporated into LNPs is a significant variable that requires attention. Not every study or formulation explicitly indicates the rationale behind the selection of quantities. Nor do they include screening varying quantities of moieties and their effects. However, it could affect the functionalization outcomes. One example is the research of Dal Magro et al., 2018, where they showed that increases in functionalization content do not necessarily lead to direct linear enhancement in BBB permeability. In fact, the most significant permeability in their study was observed at the lowest ApoE4 levels. On the contrary, they found a direct relationship between rising ApoE4 levels and increased accumulation in peripheral organs. This underscores considerations for off-target effects (refer to Section 5.2.1).

Contrastingly, the study from Kuo and Lee, 2016 showed a direct positive correlation between increasing quantities of anti-aprotinin and permeability enhancement. These contrasting findings underscore the necessity of meticulously calibrating the amount of functionalization agents, highlighting that the efficacy of functionalization strategies is not solely dependent on quantity. Optimizing these quantities through comprehensive experimentation is crucial. This reveals that a higher quantity of functionalization moiety does not universally translate to improved outcomes. Additionally, results like the reported from Neves et al., 2021 raise questions about the possibility that functionalization might interfere with the stability of the NPs. This underscores the importance of performing stability studies, as indeed applied for several authors (e.g. studies: (Neves et al., 2021; Zhao et al., 2018; Singh et al., 2016; Chen et al., 2018; Guo et al., 2020; Nasir et al., 2023; Lahkar and Kumar, 2018).

Another relevant variable on nanoparticle composition is the inclusion of surfactants and PEGylation, which may explain the relatively high number of studies classified under Section 3.6. Their role could be explained by their impact on enhancing biocompatibility and increasing circulation times (Liu et al., 2022; Ghasemian et al., 2017; Buzyurova et al., 2020; Vijayakumar et al., 2016). However, it remains unknown whether this increase in permeability is due to a direct interaction of the PEG with the endothelial cells. Alternatively, the increase in circulation times results in a greater number of nanoparticles in contact with the BBB. Nevertheless, it is important to note that alongside prolonged circulation times, some authors argue that PEGylation can limit the ability of nanoparticles to effectively penetrate target cells (Zhao et al., 2018). Sometimes surfactants are also used to obtain “stealth” and “long-circulating” nanoparticles, protected from interaction with plasma components and increasing drug permeability by fluidizing cell membranes (Graverini et al., 2018). However, some authors claim that the permeability increases due to surfactants could be attributed to a mechanism different from that observed for peptide-functionalized prototype NPs (Kadari et al., 2018) or other moieties. Given that these commonly used materials can impact permeability, potentially through

mechanisms different from those of the intended functionalization, careful consideration should be given to formula design. It is crucial to account for these components and optimize them before adding functionalization or integrate them as part of the experimental process.

The relevance of nanoparticle composition highlights the need for comprehensive investigations to enhance our understanding of how to optimize NPs for effective brain delivery. Given that the performance of NPs are highly dependent on parameter interactions (Vargas et al., 2023), adopting a Quality by Design (QbD) approach—as recommended by the International Conference on Harmonization’s Pharmaceutical Development Q8 guideline—offers a strategic pathway to address these complexities systematically. Improving the understanding of NPs interactions between functionalization and formulation can potentially increase the reproducibility, scalability, and stability of modified LNPs (Vargas et al., 2023; ICH, 2009). Future research directions could considerably benefit from the integration of QbD principles. This should focus on a comprehensive evaluation of base formulations before the addition of surface modifications, to facilitate a more targeted and effective exploration of nanoparticle-based CNS drug delivery systems.

5.2. Evaluation strategy variables as a source of variability

A critical aspect of our analysis involved the assessment of evaluation strategies used across various studies. Certainly, there are differences in the choice of BBB models, control strategies, and experimental setups such as doses, timing of analysis, quantification techniques, and efficacy evaluations. These methodological variations can substantially influence study conclusions. Such variations reinforce the difficulties in drawing direct comparisons between different studies and extracting general conclusions.

5.2.1. Type of evaluation model as a source of variability

Differences between *in vitro* and *in vivo* results are shown in Fig. 7. It also shows the limited correlation observed in the studies that combined both types of models, underscoring the need for cautious selection of evaluation strategies. Interestingly, the predominance of each type of strategy varies depending on the functionalization category, as observed in Fig. 3. For example, *in vivo* models are more commonly employed in the unfunctionalized category, as compared to the others. This observation could be attributed to a more extended understanding on the composition and behavior in biological *in vitro* systems for unfunctionalized systems. In contrast, the introduction of functionalization moieties into nanoparticles introduces new variables that may not have as much *in vitro* background. Consequently, this lack of extensive experience with functionalized nanoparticles could necessitate a more gradual transition to *in vivo* studies. This would help in understanding their complex interactions before moving to living organisms.

In vitro modeling, especially with human cell-based systems like the widely used hCMEC/D3 model, plays a key role in initial therapeutic assessments. It offers insights into potential BBB crossing. This cellular model is reported to have high representativeness (Pinheiro et al., 2020). However, some authors claim that the lack of shear conditions may lead to a higher permeability, giving rise to an overestimation of drug or nanoparticles crossing the cellular layer (Pucci et al., 2020). In fact, Pucci et al., 2020 developed a unique *in vitro* model including hCMEC/D3 and human astrocytes under dynamic flow conditions. They claimed that flow conditions were crucial to achieving more physiological phenotypic conditions for the barrier model, and thus a more accurate estimation of passage capacity.

The wide range of available *in vitro* methods differs in terms of complexity, reliability, cost and ease of implementation (Jagtiani et al., 2022; Morofuji and Nakagawa, 2020; Wilhelm and Krizbai, 2014). For instance, parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) based methods are fast and suitable for high throughput screening. However, their predictive value is questionable as it is limited to the prediction of passive diffusion (Appelt-Menzel et al., 2020; Müller et al.,

2015). Cellular-based models offer insights for both passive and active transport. However, they are labor-intensive, time consuming and generally low-throughput (Müller et al., 2015). Moreover, the physiological accuracy of these models depends on the cell source, culture complexity (ranging from mono culture to multicellular co-cultures) (Shah and Dong, 2022). It also depends on variations in methodological practices between different laboratories (Helms et al., 2015). Such variability suggests caution when comparing studies as well as selecting models for evaluating specific strategies.

In vivo studies could offer stronger conclusions on brain accumulation and efficacy, mainly due to their ability to provide comprehensive insights into systemic distribution, clearance, and overall drug delivery efficiency. This could be particularly relevant in active targeting of lipid nanoparticles to tissues other than the liver. This is due to the intrinsic hepatic accumulation of this type of vehicles. However, ethical, economic and logistical constraints often limit their application, making *in vitro* analyses a critical step for preliminary screenings. These *in vitro* results typically guide the progression to more costly and complex *in vivo* trials, underscoring the need for a judicious balance between the two types of models.

The relevance of *in vivo* models increases in terms of evaluating off-target accumulation. Detailed examinations of changes in bio-distribution are essential to study not only brain accumulation, but also assessing organ-specific selectivity. These evaluations could potentially minimize off target effects, thereby enhancing the therapeutic profile of the formulations under study. It might also help to understand whether unintended off-target accumulation might contribute to lower brain accumulation. Additionally, it can reveal if positive results achieved by a particular functionalization strategy are due to extended circulation times, lower affinity for non-target organs, or the direct exploitation of the BBB's active transport mechanisms. The importance of this aspect could be illustrated by several studies included in this review that assessed the selectiveness of their NPs accumulation; including works where selectivity indexes were calculated (for example studies (Kuo et al., 2021; Gomes et al., 2016). Such methodological approaches offer potential contributions to the study and understanding of NPs brain accumulation mechanisms.

However, drugs developed and tested in animal models often exhibit different efficacy and toxicity profiles when tested in humans (Mehta et al., 2024; Zhang et al., 2023). The challenges in preclinical to clinical translation depend on variations in BBB characteristics across species (Syvänen et al., 2009; Verscheyden et al., 2021; Dao et al., 2024; Mármol et al., 2023). For instance, human brains feature a higher proportion and increased complexity of neocortical astrocytes compared to rodents (O'Brown et al., 2018). Additionally, they show less expression of claudin-5, a relevant protein for tight junction functionality (Mármol et al., 2023). Moreover, it has been demonstrated that differences in the sequences, expression and morphology of native transporter systems affect the transportation and distribution of substances to the brain (Zhang et al., 2023; Dao et al., 2024; O'Brown et al., 2018; Plotkin et al., 2000). For example, P-glycoprotein expression is reported to be lower in the human BBB compared to rodent BBB (Syvänen et al., 2009; Verscheyden et al., 2021). This limited correlation of preclinical models highlights the necessity for innovative approaches that more accurately mimic human BBB physiology and better predict clinical outcomes.

Emerging technologies like Organ-On-a-Chip systems (OoC) (Mármol et al., 2023; Vargas et al., 2021; Kang et al., 2021) offer promising avenues to bridge this gap. These systems simulate more accurately the biological and mechanical environment of human tissues, including the BBB. Despite their potential, our review found no studies within the scope of our review utilizing OoC models for BBB research, marking a notable area for future exploration. This absence underscores the ongoing need for innovative approaches. These approaches aim to increase IVIVC for brain delivery applications. Another area that could improve prediction capacity is exploiting the potential of advanced modeling techniques, such as computational simulations, to predict

nanoparticle behavior and optimize delivery strategies. Until then, *in vivo* studies remain the basis for robust preclinical conclusions, allowing the evaluation of direct therapeutic outcomes in a more representative context, as well as assessment of biodistribution and organ interactions.

5.2.2. Selection of control strategy

Beyond model selection, the choice of an appropriate control strategy is probably one of the most relevant aspects. This choice is crucial to confirm the effect of a specific functionalization. However, we observed considerable heterogeneity in this regard. This ranged from the absence of a comparison, to the use of free drug, un-functionalized nanoparticles, or even partially functionalized (for dual strategy modifications). The lack of comparison with free drug (when possible) and with non-modified LNPs could lead to a false positive in the results. These false positives could be mistakenly attributed to the functionalization itself. For example, in the studies by Gandomi et al., 2017 and Muntoni et al., 2019, fully functionalized NPs showed greater permeability than free drug. However, it is noteworthy that functionalization reduce it compared to plain NPs. The results obtained by Loureiro et al., 2017 highlight the need for careful interpretation of positive outcomes. In their *in vitro* evaluation, they used an antibody with no specific target to the BBB as a control, yet it increased nanoparticle permeability compared to un-functionalized nanoparticles. Another illustration of the importance of establishing control strategies is the study by Basso et al., 2020, where functionalization successfully increased brain permeability compared to plain NPs, but had a negative effect compared to free drug, as the drug's permeability decreased when encapsulated.

The inclusion of different moieties as functionalization brings more relevance to the establishment of controls. The different studies presented in section 3.5 introduced extra complexity to comparison methodologies. This resulted in diverse approaches to calculating permeation enhancement. Not all studies utilized uniform controls or benchmarks. For instance, some compared the permeability of double-functionalized LNPs solely to plain LNPs (Chen et al., 2018; Basso et al., 2020), while others compared double-functionalized LNPs to those functionalized with a single moiety (Kuo et al., 2022; Guo et al., 2020; Hernando et al., 2022; Kuo and Wang, 2016). Several studies conducted more comprehensive evaluations, comparing plain, single-functionalized, and double-functionalized LNPs (Li et al., 2016; Kuo and Hsu, 2017; Kuo and Cheng, 2016; Kuo and Wang, 2017), with one study specifically assessing the separate effects of each single functionalization (Han et al., 2021). The potential conclusions that can be drawn vary with the complexity of the evaluation strategy. This subtly suggesting the potential layers of analysis involved. Particularly, the study from Han et al., 2021 allows differentiation of the individual effect of each peptide separately. Their research evaluating different functionalizations made in the same formulation, same composition and same model, one of the most comparable opportunities among the consulted bibliography.

The studies by Dal Magro et al., 2017 and Muntoni et al., 2019 highlight a crucial aspect in the design of control NPs. They modified their control NPs to avoid unintended biodistribution effects. By neutralizing reactive groups in the surface of un-modified NPs, they ensured that the only significant difference between the control and experimental nanoparticles was the absence of the functionalization effect. Such level of consideration when selecting a control strategy is crucial for accurately assessing the impact of functionalization, emphasizing the relevance of control conditions.

It is remarkable that in many cases the functionalization might be just one of many variables affecting permeability modulation. Adequate control selection might increase the strength of the conclusions. Otherwise, the reason for the permeability enhancement results cannot be fully understood, making it difficult to attribute permeability changes to the particle itself (and its composition) or to the specific modification strategy.

5.2.3. Other experimental considerations

Other experimental considerations can also affect the results of permeability. These factors can affect both specific conclusions and comparative analyses. Some examples observed within the publications included in this review involved the time of analysis. They also raise questions regarding doses or quantification techniques, and efficacy evaluations. For example, the perceived efficacy of certain strategies may shift based on the evaluation timeframe. This is exemplified by Guo et al., 2020, where the impact of transferrin inclusion varied between the second and third days of treatment (refer to Fig. 6). Similarly, Nasir et al., 2023 demonstrated that the effectiveness of functionalization decreased over time, from 2 to 6 h post-treatment (see Table S1). These results raise questions about the time dependency of effects on brain accumulation. This introduces more variables to consider when establishing appropriate evaluation periods for a given strategy.

Dosing methodologies might constitute another significant obstacle in standardizing evaluations across brain delivery studies. The variability in dosing details—ranging from precise dosage specifications to unclear or unreported dosages—complicates the direct comparison of results. It also confuses the estimation of optimal dosing strategies when designing a new study. This could be particularly crucial in discerning whether observed enhancements in brain permeability are due to the unique properties of the nanoparticle system. Alternatively, they might result from optimal dosing. Additionally, the possibility of receptor saturation (Pinheiro et al., 2020; Loureiro et al., 2015; Zhao et al., 2018; Dal Magro et al., 2018) increases the relevance for meticulous dosing methodologies to differentiate between formulation properties and dosing effects.

The application of different quantification methods also represents a limitation for comparison between studies. The distinction between detecting a labeling agent like a dye or radiolabel and directly measuring nanoparticles or therapeutic agents is significant. Depending on the observation, it might raise questions about whether nanoparticles are merely extending the drug's systemic half-life. Alternatively, they might be actively facilitating its BBB transport. The evaluation of therapeutic effects using *in vivo* models offers the opportunity for assessments in a context closer to clinical reality. However, the focus on cancer therapies within the reviewed literature brings to light the predominant use of cytotoxicity as a measure of efficacy. This requires careful consideration due to the inherent cytotoxic potential of nanoparticles themselves (Ilić et al., 2023; Nikzami et al., 2021), emphasizing the importance of incorporating control evaluations for a comprehensive understanding of therapeutic efficacy.

Despite the aforementioned heterogeneity, it is important to acknowledge the considerable value of the studies included in this review. While we have highlighted certain differences that challenge our goal of making direct comparisons, this does not diminish the significance of their contributions to the field of nanoparticle functionalization. On the contrary, these studies collectively underscore the potential of functionalization strategies to overcome the BBB barrier, offering invaluable insights into diverse effects that significantly advance our understanding in this area. Each study, with its unique findings and approaches, contributes to this field of study, paving the way for future breakthroughs in CNS drug delivery.

6. Conclusions

This review systematically explored the diverse strategies employed in the functionalization of LNPs to enhance their BBB permeability, highlighting innovative approaches that show promise in facilitating brain delivery. Our findings offer comparative insights and might help to identify future research directions in the development of more effective LNPs systems for drug delivery to the brain.

Across the evaluated categories, functionalization consistently shows potential to improve the delivery of therapeutic agents to the brain, demonstrating its role in active targeting through the BBB. Remarkably,

the included data may indicate that studies utilizing NLC, those with particle sizes below 150 nm, or those employing mixed functionalization strategies, show superior permeation enhancement. This is relative to their unfunctionalized counterparts. However, it is clear that LNPs development is a complex and unique process for each formulation, where composition plays a pivotal role in dictating permeability. The development of a successful delivery strategy goes beyond mere functionalization. It requires prior optimization of the base nanoparticles, including their composition and physical properties. This can be achieved through the integration of Quality-by-Design principles.

Challenges within the field extend to understanding off-target accumulation and the complexities of correlating *in vitro* and *in vivo* studies. Our review also highlights the complexity and heterogeneity in evaluation approaches and the selection of control strategies. The variation in methodologies across studies poses a significant challenge for direct comparison and validation of results. Moreover, we identify the selection of appropriate control strategies as a critical factor. This significantly influences the interpretation of functionalization impact. These methodological considerations highlight the importance of adopting a holistic and standardized approach to research on brain delivery of LNPs, ensuring that findings are robust, comparable, reproducible, and translatable to clinical applications. Addressing these challenges could facilitate opening the gates to the full potential of LNPs in treating a broad spectrum of neurological and psychiatric disorders and brain tumors and revolutionize CNS disease management.

Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work, authors used ChatGPT® in order to improve language quality and increase quality and readability of initial drafts. The tool assisted with refining complex sentence structures, providing synonymous expressions, and synthesizing lengthy descriptions to improve overall readability from sentences previously developed by the authors. After using this tool, the authors reviewed and edited the content as needed and take full responsibility for the content of publication.

CRediT authorship contribution statement

Ronny Vargas: Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Catalina Lizano-Barrantes:** Visualization, Formal analysis, Data curation. **Miquel Romero:** Visualization, Formal analysis, Data curation. **Kevin Valencia-Clua:** Investigation. **David A. Narváez-Narváez:** Investigation. **Josep Ma Suñé-Negre:** Resources, Project administration. **Pilar Pérez-Lozano:** Resources, Project administration. **Encarna García-Montoya:** Resources, Project administration. **Noelia Martínez-Martínez:** Investigation. **Cristina Hernández-Munain:** Resources, Project administration. **Carlos Suñé:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration. **Marc Suñé-Pou:** Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Formal analysis.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This work was possible thanks to the grant of the Office of

International Affairs of the University of Costa Rica (OAICE-64-2019) to RV; to the grant from the *Departament de Recerca i Universitats*, Generalitat de Catalunya (AGAUR 2021 SGR 01068) to EG-M; and by grants from the Spanish Ministry Of Science and Innovation (PID2020-118859 GB-I00 and PID2021-128720NB-I00) to CS and CHM.

Fig. 4-A Reprinted from Journal of Biotechnology, 331, Neves et al, Transferrin-functionalized lipid nanoparticles for curcumin brain delivery, page 115, copyright 2021 with permission from Elsevier.

Fig. 4-B Reprinted from Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 110, Yung-Chih et al, Multiple-component dual-phase solid lipid nanoparticles with conjugated transferrin for formulating antioxidants and nerve growth factor against neuronal apoptosis, page 147, copyright 2020 with permission from Elsevier.

Fig. 6 Reprinted from Journal of Controlled Release, 328, Guo et al, Incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) enhances nanodelivery of antiretroviral across the blood-brain barrier for treatment of HIV reservoir in brain, page 706, copyright 2020 with permission from Elsevier.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124686>.

References

- Accardo, A., Tesaro, D., Morelli, G., 2013. Peptide-based targeting strategies for simultaneous imaging and therapy with nanovectors. *Polym J.* 45 (5), 481–493.
- Akhtar, A., Andleeb, A., Waris, T.S., Bazzar, M., Moradi, A.R., Awan, N.R., et al., 2021. Neurodegenerative diseases and effective drug delivery: A review of challenges and novel therapeutics. *J. Control. Release* 10 (330), 1152–1167.
- Alahmari, A., 2021. Blood-brain barrier overview: structural and functional correlation. *Neural. Plast.* 2021.
- Apostolopoulos, V., Bojarska, J., Chai, T.T., Elnagdy, S., Kaczmarek, K., Matsoukas, J., et al., 2021. A global review on short peptides: frontiers and perspectives. *Mol* 26 (2), 430.
- Appelt-Menzel, A., Oerter, S., Mathew, S., Haferkamp, U., Hartmann, C., Jung, M., et al., 2020. Human iPSC-Derived Blood-Brain Barrier Models: Valuable Tools for Preclinical Drug Discovery and Development? *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 55 (1), e122.
- Arduino, I., Depalo, N., Re, F., Dal Magro, R., Pannillo, A., Margiotto, N., et al., 2020. PEGylated solid lipid nanoparticles for brain delivery of lipophilic katecholamine Pt(IV) prodrugs: An in vitro study. *Int. J. Pharm.* 15, 583.
- Arduino, I., Iacobazzi, R.M., Riganti, C., Lopodota, A.A., Perrone, M.G., Lopalco, A., et al., 2020. Induced expression of P-gp and BCRP transporters on brain endothelial cells using transferrin functionalized nanostructured lipid carriers: A first step of a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Int. J. Pharm.* 15, 591.
- Arora, S., Singh, J., 2021. In vitro and in vivo optimization of liposomal nanoparticles based brain targeted vgf gene therapy. *Int. J. Pharm.* 25, 608.
- Arora, S., Sharma, D., Singh, J., 2020. GLUT-1: An Effective Target To Deliver Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Across the Blood Brain Barrier. *ACS Chem. Neurosci.* 11 (11), 1620–1633.
- Arruero, M., Valladares, M., González-Fernández, Á., 2009. Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications. *J. Nanomater.* 1 (2009), 24.
- Athalye, M., Teli, D., Chorawala, M., Sharma, A., Patel, R., Dua, K., et al., 2024. Apolipoprotein E3 functionalized lipid-drug conjugated nanoparticles of Levitracetam for enhanced delivery to the brain: In-vitro cell line studies and in-vivo study. *Int. J. Biol. Macromol.* 1, 254.
- Banerjee, I., De, K., Mukherjee, D., Dey, G., Chattopadhyay, S., Mukherjee, M., et al., 2016. Paclitaxel-loaded solid lipid nanoparticles modified with Tyr-3-octenolide for enhanced anti-angiogenic and anti-glioma therapy. *Acta Biomater.* 1 (38), 69–81.
- Barbosa, H.F.G., Piva, H.L., Matsuo, F.S., de Lima, S.C.G., de Souza, L.E.B., Osako, M.K., et al., 2023. Hybrid lipid-biopolymer nanocarrier as a strategy for GBM photodynamic therapy (PDT). *Int. J. Biol. Macromol.* 1, 242.
- Basso, J., Mendes, M., Silva, J., Sereno, J., Cova, T., Oliveira, R., et al., 2020. Peptide-lipid nanoconstructs act site-specifically towards glioblastoma growth impairment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1 (155), 177–189.
- Bi, D., Unthan, D.M., Hu, L., Bussmann, J., Remaut, K., Barz, M., et al., 2023. Polysarcosine-based lipid formulations for intracranial delivery of mRNA. *J. Control. Release* 1 (356), 1–13.
- Bors, L.A., Erdő, F., 2019. Overcoming the blood-brain barrier. challenges and tricks for CNS drug delivery. *Sci. Pharm.* 87 (1), 6.
- Buzuyurova, D.N., Pashirova, T.N., Zueva, I.V., Burilova, E.A., Shaihtudinova, Z.M., Rizvanov, I.K., et al., 2020. Surface modification of pralidoxime chloride-loaded solid lipid nanoparticles for enhanced brain reactivation of organophosphorus-inhibited AChE: Pharmacokinetics in rat. *Toxicology* 1, 444.
- Byrnes, A.E., Domínguez, S.L., Yen, C.W., Laufer, B.I., Foreman, O., Reichelt, M., et al., 2023. Lipid nanoparticle delivery limits antisense oligonucleotide activity and cellular distribution in the brain after intracerebroventricular injection. *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* 13 (32), 773–793.
- Chen, B., Luo, M., Liang, J., Zhang, C., Gao, C., Wang, J., et al., 2018. Surface modification of PGP for a neutrophil-nanoparticle co-vehicle to enhance the anti-depressant effect of baicalin. *Acta Pharm. Sin. B* 8 (1), 64–73.
- Chen, L., Watson, C., Morsch, M., Cole, N.J., Chung, R.S., Saunders, D.N., et al., 2017. Improving the delivery of SOD1 antisense oligonucleotides to motor neurons using calcium phosphate-lipid nanoparticle. *Front. Neurosci.* 11 (AUG).
- Correia, A.C., Monteiro, A.R., Silva, R., Moreira, J.N., Sousa Lobo, J.M., Silva, A.C., 2022. Lipid nanoparticles strategies to modify pharmacokinetics of central nervous system targeting drugs: Crossing or circumventing the blood-brain barrier (BBB) to manage neurological disorders. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1, 189.
- Dal Magro, R., Ornaghi, F., Cambianica, L., Beretta, S., Re, F., Musicanti, C., et al., 2017. ApoE-modified solid lipid nanoparticles: A feasible strategy to cross the blood-brain barrier. *J. Control. Release* 249, 103–110.
- Dal Magro, R., Albertini, B., Beretta, S., Rigolio, R., Donzelli, E., Chiorazzi, A., et al., 2018. Artificial apolipoprotein corona enables nanoparticle brain targeting. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 14 (2), 429–438.
- Dao, L., You, Z., Lu, L., Xu, T., Sarkar, A.K., Zhu, H., et al., 2024. Modeling blood-brain barrier formation and cerebral cavernous malformations in human PSC-derived organoids. *Cell Stem Cell* 31 (6), 818–833.e11.
- De La Rica, R., Matsui, H., 2010. Applications of peptide and protein-based materials in bionanotechnology. *Chem. Soc. Rev.* 39 (9), 3499–3509.
- Di Filippo, L.D., Lobato Duarte, J., Hofstätter Azambuja, J., Isler Mancuso, R., Tavares Luiz, M., Hugo Sousa Araújo, V., et al., 2022. Glioblastoma multiforme targeted delivery of docetaxel using bevacizumab-modified nanostructured lipid carriers impair in vitro cell growth and in vivo tumor progression. *Int. J. Pharm.* 618.
- Ding, S., Khan, A.I., Cai, X., Song, Y., Lyu, Z., Du, D., et al., 2020. Overcoming blood-brain barrier transport: Advances in nanoparticle-based drug delivery strategies. *Mater. Today* 37 (August), 112–125.
- Du, Q., Liu, Y., Fan, M., Wei, S., Ismail, M., Zheng, M., 2024. PEG length effect of peptide-functional liposome for blood brain barrier (BBB) penetration and brain targeting. *J. Control. Release* 1 (372), 85–94.
- Ebrahimi, H., Kazem Nezhad, S., Farmoudeh, A., Babaei, A., Ebrahimnejad, P., Akbari, E., et al., 2022. Design and optimization of metformin-loaded solid lipid nanoparticles for neuroprotective effects in a rat model of diffuse traumatic brain injury: A biochemical, behavioral, and histological study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1 (181), 122–135.
- Ekhtor, C., Qureshi, M.Q., Zuberi, A.W., Hussain, M., Sangroula, N., Yerra, S., et al., 2023. Advances and opportunities in nanoparticle drug delivery for central nervous system disorders: a review of current advances. *Cureus.* 15 (8) e44302.
- Espósito, E., Cortesi, R., Drechsler, M., Fan, J., Fu, B.M., Calderan, L., et al., 2017. Nanoformulations for dimethyl fumarate: Physicochemical characterization and in vitro/in vivo behavior. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1 (115), 285–296.
- Ferraris, C., Cavalli, R., Panciani, P.P., Battaglia, L., 2020. Overcoming the blood-brain barrier: Successes and challenges in nanoparticle-mediated drug delivery systems for the treatment of brain tumours. *Int. J. Nanomed.* 15, 2999–3022.
- Figueroa, E.G., Caballero-Román, A., Tico, J.R., Miñarro, M., Nardi-Ricart, A., González-Candia, A., 2022. miRNA nanoencapsulation to regulate the programming of the blood-brain barrier permeability by hypoxia. *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* 1 (3), 100129.
- Gadgil, P., Shah, J., Chow, D.S.L., 2018. Enhanced brain delivery with lower hepatic exposure of lazaroid loaded nanostructured lipid carriers developed using a design of experiment approach. *Int. J. Pharm.* 544 (1), 265–277.
- Gaillard, P.J., Appeldoorn, C.C.M., Dorland, R., Van Kregten, J., Manca, F., 2014. Pharmacokinetics, Brain Delivery, and Efficacy in Brain Tumor-Bearing Mice of Glutathione Pegylated Liposomal Doxorubicin (2B3-101). *PLoS One* 9 (1), 82331.
- Gandomi, N., Varshochian, R., Atyabi, F., Ghahremani, M.H., Sharifzadeh, M., Amini, M., et al., 2017. Solid lipid nanoparticles surface modified with anti-Contactin-2 or anti-Neurofascin for brain-targeted delivery of medicines. *Pharm. Dev. Technol.* 22 (3), 426–435.
- Ghasemian, E., Vatanara, A., Navidi, N., Rouini, M.R., 2017. Brain delivery of baclofen as a hydrophilic drug by nanolipid carriers: Characteristics and pharmacokinetics evaluation. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 1 (37), 67.
- Gomes, M.J., Dreier, J., Brewer, J., Martins, S., Brandl, M., Sarmento, B., 2016. A new approach for a blood-brain barrier model based on phospholipid vesicles: Membrane development and siRNA-loaded nanoparticles permeability. *J. Memb. Sci.* 1 (503), 8–15.
- Gomes, M.J., Fernandes, C., Martins, S., Borges, F., Sarmento, B., 2017. Tailoring Lipid and Polymeric Nanoparticles as siRNA Carriers towards the Blood-Brain Barrier – from Targeting to Safe Administration. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 12 (1), 107–119.
- Graverini, G., Piazzini, V., Landucci, E., Pantano, D., Nardiello, P., Casamenti, F., et al., 2018. Solid lipid nanoparticles for delivery of andrographolide across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 1 (161), 302–313.
- Guillama Barroso, G., Narayan, M., Alvarado, M., Armendariz, I., Bernal, J., Carabaza, X., et al., 2020. Nanocarriers as potential drug delivery candidates for overcoming the blood-brain barrier: challenges and possibilities. *ACS Omega* 5 (22), 12583–12595.
- Guo, P., Si, M., Wu, D., Xue, H.Y., Hu, W., Wong, H.L., 2020. Incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) enhances nanodelivery of antiretroviral across the blood-brain barrier for treatment of HIV reservoir in brain. *J. Control. Release* 10 (328), 696–709.
- Guyon, L., Groo, A.C., Malzert-Fréon, A., 2020. Relevant Physicochemical Methods to Functionalize, Purify, and Characterize Surface-Decorated Lipid-Based Nanocarriers. *Mol. Pharm.* 4 (18), 44–64.

- Han, Y., Gao, C.C., Wang, H., Sun, J., Liang, M., Feng, Y., et al., 2021. Macrophage membrane-coated nanocarriers Co-Modified by RVG29 and TPP improve brain neuronal mitochondria-targeting and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease mice. *Bioact. Mater.* 6 (2), 529–542.
- Hatami Nemat, S., Bigdeli, M.R., Mortazavi Moghadam, F., Sharifi, K., 2023. Neuroprotective effects of niosomes loaded with thymoquinone in the cerebral ischemia model of male Wistar rats. *Nanomedicine Nanotechnology. Biol. Med.* 1, 48.
- He, H., Yao, J., Zhang, Y., Chen, Y., Wang, K., Lee, R.J., et al., 2019. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system to cross the blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 519 (2), 385–390.
- Helms, H.C., Abbott, N.J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P.O., Deli, M.A., et al., 2015. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36 (5), 862–890.
- Hernando, S., Nikolakopoulou, P., Voulgaris, D., Hernandez, R.M., Igartua, M., Herland, A., 2022. Dual effect of TAT functionalized DHAH lipid nanoparticles with neurotrophic factors in human BBB and microglia cultures. *Fluids Barriers CNS.* 19 (1).
- Huang, R., Zhu, Y., Lin, L., Song, S., Cheng, L., Zhu, R., 2020. Solid Lipid Nanoparticles Enhanced the Neuroprotective Role of Curcumin against Epilepsy through Activation of Bcl-2 Family and P38 MAPK Pathways. *ACS Chem. Neurosci.* 11 (13), 1985–1995.
- ICH. Pharmaceutical Development Q8. Vol. 8, ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2009.
- Ilić, T., Đoković, J.B., Nikolić, I., Mitrović, J.R., Pantelić, I., Savić, S.D., et al., 2023. Parenteral Lipid-Based Nanoparticles for CNS Disorders: Integrating Various Facets of Preclinical Evaluation towards More Effective Clinical Translation. *Pharm* 15 (2), 443.
- Ilinskaya, A.N., Dobrovol'skaia, M.A., 2016. Understanding the immunogenicity and antigenicity of nanomaterials: Past, present and future. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15 (299), 70–77.
- Jagtiani, E., Yeolekar, M., Naik, S., Patravale, V., 2022. In vitro blood brain barrier models: An overview. *J. Control. Release* 1 (343), 13–30.
- Jain, D., Hasan, N., Zafar, S., Thakur, J., Haider, K., Parvez, S., et al., 2023. Transferrin functionalized nanostructured lipid carriers for targeting Rivastigmine and Resveratrol to Alzheimer's disease: Synthesis, in vitro characterization and brain uptake analysis. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 1, 86.
- Jia, J., Wang, Z., Yue, T., Su, G., Teng, C., Yan, B., 2020. Crossing biological barriers by engineered nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 33 (5), 1055–1060.
- Kadari, A., Pooja, D., Gora, R.H., Gudem, S., Kolapalli, V.R.M., Kulhari, H., et al., 2018. Design of multifunctional peptide collaborated and docetaxel loaded lipid nanoparticles for antiangioma therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1 (132), 168–179.
- Kang, S., Park, S.E., Huh, D.D., 2021. Organ-on-a-chip technology for nanoparticle research. *Nano Converg.* 8 (1), 20.
- Kato, N., Yamada, S., Suzuki, R., Iida, Y., Matsumoto, M., Fumoto, S., et al., 2023. Development of an apolipoprotein E mimetic peptide-lipid conjugate for efficient brain delivery of liposomes. *Drug Deliv.* 30 (1).
- Kaur, H., Kumar, B., Chakrabarti, A., Medhi, B., Modi, M., Radotra, B.D., et al., 2018. A new therapeutic approach for brain delivery of epigallocatechin gallate: development and characterization studies. *Curr. Drug Deliv.* 16 (1), 59–65.
- Khan, N., Shah, F.A., Rana, I., Ansari, M.M., Din, F., Rizvi, S.Z.H., et al., 2020. Nanostructured lipid carriers-mediated brain delivery of carbamazepine for improved in vivo anticonvulsant and anxiolytic activity. *Int. J. Pharm.* 577.
- Khare, P., Edgecomb, S.X., Hamadani, C.M., Tanner, E.E.L., Manickam, S.D., 2023. Lipid nanoparticle-mediated drug delivery to the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 197, 114861.
- Khatoun, R., Alam, A., Sharma, K., 2020. Current approaches and prospective drug targeting to brain. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*
- Kumar, P., Sharma, G., Kumar, R., Singh, B., Malik, R., Katore, O.P., et al., 2016. Promises of a biocompatible nanocarrier in improved brain delivery of quercetin: Biochemical, pharmacokinetic and biodistribution evidences. *Int. J. Pharm.* 515 (1–2), 307–314.
- Kuo, Y.C., Wang, I.H. Enhanced delivery of etoposide across the blood–brain barrier to restrain brain tumor growth using melanotransferrin antibody- and tamoxifen-conjugated solid lipid nanoparticles. <http://dx.doi.org/sire.ub.edu/103109/1061186X20151132223>. 2016 Aug 8;24(7):645–54.
- Kuo, Y.C., Chao, I.W., 2016. Conjugation of melanotransferrin antibody on solid lipid nanoparticles for mediating brain cancer malignancy. *Biotechnol. Prog.* 32 (2), 480–490.
- Kuo, Y.C., Cheng, S.J., 2016. Brain targeted delivery of carmustine using solid lipid nanoparticles modified with tamoxifen and lactoferrin for antitumor proliferation. *Int. J. Pharm.* 499 (1–2), 10–19.
- Kuo, Y.C., Hsu, C.C., 2017. Anti-melanotransferrin and apolipoprotein E on doxorubicin-loaded cationic solid lipid nanoparticles for pharmacotherapy of glioblastoma multiforme. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 1 (77), 10–20.
- Kuo, Y.C., Lee, I.H., 2016. Delivery of doxorubicin to glioblastoma multiforme in vitro using solid lipid nanoparticles with surface apolipoprotein and melanotransferrin antibody for enhanced chemotherapy. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 1 (61), 32–45.
- Kuo, Y.C., Lee, C.H., 2016. Dual targeting of solid lipid nanoparticles grafted with 83–14 MAb and anti-EGF receptor for malignant brain tumor therapy. *Life Sci.* 1 (146), 222–231.
- Kuo, Y.C., Wang, I.H., 2017. Using catanionic solid lipid nanoparticles with wheat germ agglutinin and lactoferrin for targeted delivery of etoposide to glioblastoma multiforme. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 1 (77), 73–82.
- Kuo, Y.C., Lou, Y.I., Rajesh, R., Chen, C.L., 2020. Multiple-component dual-phase solid lipid nanoparticles with conjugated transferrin for formulating antioxidants and nerve growth factor against neuronal apoptosis. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 1 (110), 140–152.
- Kuo, Y.C., Wang, I.H., Rajesh, R., 2021. Use of leptin-conjugated phosphatidic acid liposomes with resveratrol and epigallocatechin gallate to protect dopaminergic neurons against apoptosis for Parkinson's disease therapy. *Acta Biomater.* 1 (119), 360–374.
- Kuo, Y.C., Yang, I.S., Rajesh, R., 2022. Suppressed XIAP and cIAP expressions in human brain cancer stem cells using BV6- and GDC0152-encapsulated nanoparticles. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 1, 135.
- Lahkar, S., Kumar, D.M., 2018. Surface modified kokum butter lipid nanoparticles for the brain targeted delivery of nevirapine. *J. Microencapsul.* 35 (7–8), 680–694.
- Li, L., Di, X., Zhang, S., Kan, Q., Liu, H., Lu, T., et al., 2016. Large amino acid transporter 1 mediated glutamate modified docetaxel-loaded liposomes for glioma targeting. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 1 (141), 260–267.
- Li, Q., Tang, Z., Zhang, Y., Yuan, T., Yuan, B., Du, L., et al., 2023. Application of low-intensity ultrasound by opening blood–brain barrier for enhanced brain-targeted drug delivery. *Int. J. Pharm.* 25, 642.
- Liu, S., Liu, J., Li, H., Mao, K., Wang, H., Meng, X., et al., 2022. An optimized ionizable cationic lipid for brain tumor-targeted siRNA delivery and glioblastoma immunotherapy. *Biomaterials* 1, 287.
- Loureiro, J.A., Gomes, B., Coelho, M.A., Do Carmo Pereira, M., Rocha, S., 2015. Immunoliposomes doubly targeted to transferrin receptor and to α -synuclein. *Futur Sci OA.* 1 (4).
- Loureiro, J.A., Andrade, S., Duarte, A., Neves, A.R., Queiroz, J.F., Nunes, C., et al., 2017. Resveratrol and Grape Extract-loaded Solid Lipid Nanoparticles for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Mol* 22 (2), 277.
- Lu, R.M., Hwang, Y.C., Liu, I.J., Lee, C.C., Tsai, H.Z., Li, H.J., et al., 2020. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* 27 (1), 1–30.
- Ma, F., Yang, L., Sun, Z., Chen, J., Rui, X., Glass, Z., et al., 2020. Neurotransmitter-derived lipoids (NT-lipoids) for enhanced brain delivery through intravenous injection. *Sci. Adv.* 6 (30).
- Makhdoomi, S., Mahboobian, M.M., Haddadi, R., Komaki, A., Mohammadi, M., 2022. Silibinin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) ameliorated cognitive deficits and oxidative damages in aluminum chloride-induced neurotoxicity in male mice. *Toxicology* 1, 477.
- Mante, P.K., Adomako, N.O., Antwi, P., Kusi-Boadum, N.K., Osafo, N., 2021. Solid-lipid nanoparticle formulation improves antiepileptic action of cryptolepine. *Biomed. Pharmacother.* 1, 137.
- Marinelli, L., Dimmito, M.P., Cacciatore, I., Toto, E.C., Di Rienzo, A., Palmerio, F., et al., 2023. Exploring the application of Solid Lipid Nanoparticles loaded with Capsaicin rich extract in Parkinson's disease. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.*, 105097.
- Marino, A., Camponovo, A., Degl'Innocenti, A., Bartolucci, Tapeinos, C., Martinelli, C., et al., 2019. Multifunctional temozolomide-loaded lipid superparamagnetic nanovectors: dual targeting and disintegration of glioblastoma spheroids by synergic chemotherapy and hyperthermia treatment. *Nanoscale* 11 (44), 21227–21248.
- Mármol, I., Abizanda-Campo, S., Ayuso, J.M., Ochoa, I., Oliván, S., 2023. Towards Novel Biomimetic In Vitro Models of the Blood-Brain Barrier for Drug Permeability Evaluation. *Bioeng* 10 (5), 572.
- Marques, A.C., Costa, P.J., Velho, S., Amaral, M.H., 2020. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies. *J. Control. Release* 10 (320), 180–200.
- Maussang, D., Rip, J., van Kregten, J., van den Heuvel, A., van der Pol, S., van der Boom, B., et al., 2016. Glutathione conjugation dose-dependently increases brain-specific liposomal drug delivery in vitro and in vivo. *Drug Discov. Today Technol.* 1 (20), 59–69.
- McConnell, E.M., Ventura, K., Dwyer, Z., Hunt, V., Koudrina, A., Holahan, M.R., et al., 2019. In Vivo Use of a Multi-DNA Aptamer-Based Payload/Targeting System To Study Dopamine Dysregulation in the Central Nervous System. *ACS Chem. Neurosci.* 10 (1), 371–383.
- Mehta, P., Soliman, A., Rodriguez-Vera, L., Schmidt, S., Muniz, P., Rodriguez, M., et al., 2024. Interspecies Brain PBPK Modeling Platform to Predict Passive Transport through the Blood-Brain Barrier and Assess Target Site Disposition. *Pharmaceutics*. 16 (2), 226.
- Mendes, M., Nunes, S., Cova, T., Branco, F., Dyrks, M., Koksche, B., et al., 2024. Charge-switchable cell-penetrating peptides for rerouting nanoparticles to glioblastoma treatment. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 1, 241.
- Meng, F., Asghar, S., Xu, Y., Wang, J., Jin, X., Wang, Z., et al., 2016. Design and evaluation of lipoprotein resembling curcumin-encapsulated protein-free nanostructured lipid carrier for brain targeting. *Int. J. Pharm.* 506 (1–2), 46–56.
- Menon, I., Zaroudi, M., Zhang, Y., Aisenbrey, E., Hui, L., 2022. Fabrication of active targeting lipid nanoparticles: Challenges and perspectives. *Mater Today Adv.* 1, 16.
- Mishra, A., Kumar, R., Mishra, J., Dutta, K., Ahlawat, P., Kumar, A., et al., 2023. Strategies facilitating the permeation of nanoparticles through blood-brain barrier: An insight towards the development of brain-targeted drug delivery system. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 1 (86), 104694.
- Morofuji, Y., Nakagawa, S., 2020. Drug Development for Central Nervous System Diseases Using In vitro Blood-brain Barrier Models and Drug Repositioning. *Curr. Pharm. Des.* 26 (13), 1466–1485.
- Müller, J., Esso, K., Dargó, G., Könczöl, Á., Balogh, G.T., 2015. Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15 (79), 53–60.
- Muntoni, E., Martina, K., Marini, E., Giorgis, M., Lazzarato, L., Salaroglio, I.C., et al., 2019. Methotrexate-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Protein Functionalization to Improve Brain Biodistribution. *Pharmaceutics*. 11 (2).
- Nasir, S., Nazir, S., Hanif, R., Javed, A., 2023. Glioblastoma Multiforme: Probing Solutions to Systemic Toxicity towards High-Dose Chemotherapy and Inflammatory Influence in Resistance against Temozolomide. *Pharmaceutics*. 15 (2).

- Neves, A.R., Queiroz, J.F., Reis, S., 2016. Brain-targeted delivery of resveratrol using solid lipid nanoparticles functionalized with apolipoprotein E. *J. Nanobiotechnology*. 14 (1).
- Neves, A.R., Queiroz, J.F., Lima, S.A.C., Reis, S., 2017. Apo E-Functionalization of Solid Lipid Nanoparticles Enhances Brain Drug Delivery: Uptake Mechanism and Transport Pathways. *Bioconjug. Chem.* 28 (4), 995–1004.
- Neves, A.R., van der Putten, L., Queiroz, J.F., Pinheiro, M., Reis, S., 2021. Transferrin-functionalized lipid nanoparticles for curcumin brain delivery. *J. Biotechnol.* 10 (331), 108–117.
- Nikzami, M., Akbarzadeh, A., Panahi, Y., 2021. An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 1 (61), 102316.
- Nong, J., Glassman, P.M., Reyes-Esteves, S., Descamps, H.C., Shuvaev, V.V., Kiseleva, R. Y., et al., 2023. Targeting lipid nanoparticles to the blood brain barrier to ameliorate acute ischemic stroke. *bioRxiv Prepr Serv Biol.*
- Nong, J., Glassman, P.M., Shuvaev, V.V., Reyes-Esteves, S., Descamps, H.C., Kiseleva, R. Y., et al., 2024. Targeting lipid nanoparticles to the blood-brain barrier to ameliorate acute ischemic stroke. *Mol. Ther.* 32 (5), 1344–1358.
- Nowak, M., Helgeson, M.E., Mitragotri, S., 2020. Delivery of nanoparticles and macromolecules across the blood-brain barrier. *Adv. Ther.* 3 (1), 1900073.
- O’Brown, N.M., Pfau, S.J., Gu, C., 2018. Bridging barriers: a comparative look at the blood–brain barrier across organisms. *Genes Dev.* 32 (7–8), 466–478.
- Page, M.J., McKenzie, J.E., Bossuyt, P.M., Boutron, I., Hoffmann, T.C., Mulrow, C.D., et al., 2021. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 29, 372.
- Pandian, S.R.K., Pavadai, P., Vellaisamy, S., Ravishanker, V., Palanisamy, P., Sundar, L. M., et al., 2021. Formulation and evaluation of rutin-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of brain tumor. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 394 (4), 735–749.
- Pandit, R., Chen, L., Götz, J., 2020. The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1 (165–166), 1–14.
- Patra, S., Dey, J., Kar, S., Chakraborty, A., 2024. Delivery of Chlorambucil to the Brain Using Surface Modified Solid Lipid Nanoparticles. *ACS Appl Bio Mater.* 7 (5), 3403–3413.
- Pavlov, R.V., Gaynanova, G.A., Kuznetsova, D.A., Vasileva, L.A., Zueva, I.V., Sapunova, A.S., et al., 2020. Biomedical potentialities of cationic geminis as modulating agents of liposome in drug delivery across biological barriers and cellular uptake. *Int. J. Pharm.* 25, 587.
- Pinheiro, R.G.R., Granja, A., Loureiro, J.A., Pereira, M.C., Pinheiro, M., Neves, A.R., et al., 2020. Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer’s disease. *Eur. J. Pharm. Sci.* 30, 148.
- Pinheiro, R.G.R., Granja, A., Loureiro, J.A., Pereira, M.C., Pinheiro, M., Neves, A.R., et al., 2020. RVG29-Functionalized Lipid Nanoparticles for Quercetin Brain Delivery and Alzheimer’s Disease. *Pharm. Res.* 37 (7).
- Plotkin, S.R., Banks, W.A., Maness, L.M., Kastin, A.J., 2000. Differential transport of rat and human interleukin-1 α across the blood–brain barrier and blood–testis barrier in rats. *Brain Res.* 881 (1), 57–61.
- Pucci, C., De Pasquale, D., Marino, A., Martinelli, C., Lauciello, S., Ciofani, G., 2020. Hybrid Magnetic Nanovectors Promote Selective Glioblastoma Cell Death through a Combined Effect of Lysosomal Membrane Permeabilization and Chemotherapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12 (26), 29037–29055.
- Rajora, M.A., Ding, L., Valic, M., Jiang, W., Overchuk, M., Chen, J., et al., 2017. Tailored theranostic apolipoprotein E3 porphyrin-lipid nanoparticles target glioblastoma. *Chem. Sci.* 8 (8), 5371–5384.
- Ray, R.M., Hansen, A.H., Taskova, M., Jandl, B., Hansen, J., Soemardy, C., et al., 2021. Enhanced target cell specificity and uptake of lipid nanoparticles using RNA aptamers and peptides. *Bellinst. J. Org. Chem.* 26 (17), 891–907.
- Reginald-Opata, J.N., Svirskis, D., Paek, S.Y., Tang, M., O’Carroll, S.J., Dean, J.M., et al., 2022. The involvement of extracellular vesicles in the transcytosis of nanoliposomes through brain endothelial cells, and the impact of liposomal pH-sensitivity. *Mater. Today Bio.* 13, 100212.
- Rojekar, S., Fotooh Abadi, L., Pai, R., Mahajan, K., Kulkarni, S., Vavia, P.R., 2021. Multi-organ targeting of HIV-1 viral reservoirs with etravirine loaded nanostructured lipid carrier: An in-vivo proof of concept. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1, 164.
- Rubab, S., Naeem, K., Rana, I., Khan, N., Afridi, M., Ullah, I., et al., 2021. Enhanced neuroprotective and antidepressant activity of curcumin-loaded nanostructured lipid carriers in lipopolysaccharide-induced depression and anxiety rat model. *Int. J. Pharm.* 15, 603.
- Salem, F., Ahmed, M., Omar, M.M., 2015. Drug Design, Development and Therapy Dovepress Targeting brain cells with glutathione-modulated nanoliposomes: in vitro and in vivo study. *Drug Des. Devel. Ther.*
- Sánchez-Navarro, M., Giral, E., Teixidó, M., 2017. Blood–brain barrier peptide shuttles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1 (38), 134–140.
- Sapsford, K.E., Algar, W.R., Berti, L., Gemmill, K.B., Casey, B.J., Oh, E., et al., 2013. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chem. Rev.* 113 (3), 1904–2074.
- Scioli Montoto, S., Sbaraglini, M.L., Talevi, A., Couyoupetrou, M., Di Ianni, M., Pesce, G. O., et al., 2018. Carbamazepine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 1 (167), 73–81.
- Sela, M., Poley, M., Mora-Raimondo, P., Kagan, S., Avital, A., Kaduri, M., et al., 2023. Brain-targeted liposomes loaded with monoclonal antibodies reduce alpha-synuclein aggregation and improve behavioral symptoms in parkinson’s disease. *Adv. Mater.*
- Shah, B., Dong, X., 2022. Current Status of In Vitro Models of the Blood-Brain Barrier. *Curr. Drug Deliv.* 19 (10), 1034–1046.
- Shan, X., Gong, X., Li, J., Wen, J., Li, Y., Zhang, Z., 2022. Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. *Acta Pharm. Sin.* B 12 (7), 3028–3048.
- Singh, I., Swami, R., Pooja, D., Jeengar, M.K., Khan, W., Sistla, R., 2016. Lactoferrin bioconjugated solid lipid nanoparticles: A new drug delivery system for potential brain targeting. *J. Drug Target.* 24 (3), 212–223.
- Spicer, C.D., Jumeaux, C., Gupta, B., Stevens, M.M., 2018. Peptide and protein nanoparticle conjugates: versatile platforms for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* 47 (10), 3574–3620.
- Sun, J., Liu, J., Gao, C., Zheng, J., Zhang, J., Ding, Y., et al., 2022. Targeted delivery of PARP inhibitors to neuronal mitochondria via biomimetic engineered nanosystems in a mouse model of traumatic brain injury. *Acta Biomater.* 1 (140), 573–585.
- Syvänen, S., Lindhe, Ö., Palmer, M., Kornum, B.R., Rahman, O., Långström, B., et al., 2009. Species Differences in Blood-Brain Barrier Transport of Three Positron Emission Tomography Radioligands with Emphasis on P-Glycoprotein Transport. *Drug Metab. Dispos.* 37 (3), 635–643.
- Tang, L., Zhang, R., Wang, Y., Liu, M., Hu, D., Wang, Y., et al., 2024. A blood–brain barrier- and blood–brain tumor barrier-penetrating siRNA delivery system targeting gliomas for brain tumor immunotherapy. *J. Control. Release* 1 (369), 642–657.
- Teixeira, M.I., Lopes, C.M., Amaral, M.H., Costa, P.C., 2023. Surface-modified lipid nanocarriers for crossing the blood-brain barrier (BBB): A current overview of active targeting in brain diseases. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 1 (221), 112999.
- Tosi, G., Duskey, J.T., Kreuter, J., 2019. Nanoparticles as carriers for drug delivery of macromolecules across the blood-brain barrier. *Expert Opin. Drug Deliv.* 17 (1), 23–32.
- Upadhyay, R.K., 2014. Drug delivery systems, CNS protection, and the blood brain barrier. *Biomed. Res. Int.*
- Vargas, R., Egburde-sifre, A., Medina, L., 2021. Organ-on-a-Chip systems for new drugs development. *ADMET DMPK.* 9 (2), 111–141.
- Vargas R, Romero M, Berasategui T, Narváez-Narváez DA, Ramírez P, Nardi-Ricart A, et al. Dialysis is a key factor modulating interactions between critical process parameters during the microfluidic preparation of lipid nanoparticles. *Colloids Interface Sci Commun.* 2023;54(March). <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2023.100709>.
- Veiga, N., Diesendruck, Y., Peer, D., 2023. Targeted nanomedicine: Lessons learned and future directions. *J. Control. Release* 1 (355), 446–457.
- Verscheijden, L.F.M., Koenderink, J.B., de Wildt, S.N., Russel, F.G.M., 2021. Differences in P-glycoprotein activity in human and rodent blood–brain barrier assessed by mechanistic modelling. *Arch. Toxicol.* 95 (9), 3015–3029.
- Vijayakumar, M.R., Vajanthri, K.Y., Balavigneswaran, C.K., Mahto, S.K., Mishra, N., Muthu, M.S., et al., 2016. Pharmacokinetics, biodistribution, in vitro cytotoxicity and biocompatibility of Vitamin E TPGS coated trans resveratrol liposomes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 1 (145), 479–491.
- Vijayakumar, M.R., Kosuru, R., Vuddanda, P.R., Singh, S.K., Singh, S., 2016. Trans resveratrol loaded DSPE PEG 2000 coated liposomes: An evidence for prolonged systemic circulation and passive brain targeting. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 1 (33), 125–135.
- Wanat, K., 2020. Biological barriers, and the influence of protein binding on the passage of drugs across them. *Mol. Biol. Reports* 47 (4), 3221–3231.
- Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., et al., 2022. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduct. Target Ther* 7 (1), 1–27.
- Wilhelm, I., Krizbai, I.A., 2014. In vitro models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain. *Mol. Pharm.* 11 (7), 1949–1963.
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., Wang, Y., 2023. The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduct. Target. Ther.* 8 (1), 1–27.
- Wu, L., Huang, W., Peng, K., Wang, Y., Chen, Q., Lu, B., 2023. Enhancing the stability, BBB permeability and neuroprotective activity of verbascoide in vitro using lipid nanocapsules in combination with menthol. *Food Chem.* 15, 414.
- Wu, Y., Song, X., Kebebe, D., Li, X., Xue, Z., Li, J., et al., 2019. Brain targeting of Baicalin and Salvianolic acid B combination by OX26 functionalized nanostructured lipid carriers. *Int. J. Pharm.* 25, 571.
- Wu, X., Yuan, R., Xu, Y., Wang, K., Yuan, H., Meng, T., et al., 2024. Functionalized lipid nanoparticles modulate the blood-brain barrier and eliminate α -synuclein to repair dopamine neurons. *Asian J. Pharm. Sci.* 19 (2), 100904.
- Zhang, Z., Cao, W., Xing, H., Guo, S., Huang, L., Wang, L., et al., 2023. A mix & act liposomes of phospholipase A2-phosphatidylserine for acute brain detoxification by blood-brain barrier selective-opening. *Acta Pharm. Sin. B.*
- Zhang, W., Liu, Q.Y., Haqqani, A.S., Liu, Z., Sodja, C., Leclerc, S., et al. Differential Expression of ABC Transporter Genes in Brain Vessels vs. Peripheral Tissues and Vessels from Human, Mouse and Rat. *Pharmaceutics.* 2023 May 1;15(5):1563.
- Zhang, W., Mehta, A., Tong, Z., Esser, L., Voelcker, N.H., Zhang, W., et al., 2021. Development of Polymeric Nanoparticles for Blood-Brain Barrier Transfer—Strategies and Challenges. *Adv. Sci.* 8 (10), 2003937.
- Zhao, Y., Gan, L., Ren, L., Lin, Y., Ma, C., Lin, X., 2022. Factors influencing the blood-brain barrier permeability. *Brain Res.* 1, 1788.
- Zhao, C., Zhang, J., Hu, H., Qiao, M., Chen, D., Zhao, X., et al., 2018. Design of lactoferrin modified lipid nano-carriers for efficient brain-targeted delivery of nimodipine. *Mater. Sci. Eng. C* 1 (92), 1031–1040.
- Zwain, T., Alder, J.E., Sabagh, B., Shaw, A., Burrow, A.J., Singh, K.K., 2021. Tailoring functional nanostructured lipid carriers for glioblastoma treatment with enhanced permeability through in-vitro 3D BBB/BBTB models. *Mater. Sci. Eng. C* 1, 121.
- Zwain, T., Alder, J.E., Zwayen, S., Shaw, A., Burrow, A.J., Singh, K.K., 2023. Overcoming biological barriers BBB/BBTB by designing PUFA functionalised lipid-based nanocarriers for glioblastoma targeted therapy. *Biomater Adv.* 155, 213660.

Anexo 2-4

Vargas R, Lizano-Barrantes C, Romero M, Valencia-Clua K, Narváez-Narváez DA, Suñé-Negre JM, et al. The piper at the gates of brain: A systematic review of surface modification strategies on lipid nanoparticles to overcome the Blood-Brain-Barrier. *Int J Pharm* [Internet]. 2024 Sep 13 [cited 2024 Sep 18]; 665(124686). Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517324009207>
[Información suplementaria]

The piper at the gates of brain: A systematic review of surface modification strategies on lipid nanoparticles to overcome the Blood-Brain-Barrier

Supplementary Information

Ronny Vargas^{1-2*}, Catalina Lizano-Barrantes³, Miquel Romero¹, Kevin Valencia-Clua¹, David A. Narváez-Narváez, Josep M^a Suñé-Negre¹⁻⁴, Pilar Pérez-Lozano¹⁻⁴, Encarna García-Montoya¹⁻⁴, Noelia Martinez-Martinez⁵, Cristina Hernández-Munain⁶, Carlos Suñé^{5*}, Marc Suñé-Pou¹⁻⁴

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

² Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

³ Department of Pharmaceutical Care and Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

⁴ Pharmacotherapy, Pharmacogenetics and Pharmaceutical Technology Research Group Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain.

⁵ Department of Molecular Biology, Institute of Parasitology and Biomedicine "López-Neyra" (IPBLN-CSIC), Granada, Spain.

⁶ Department of Cell Biology and Immunology, Institute of Parasitology and Biomedicine "López-Neyra" (IPBLN-CSIC), Granada, Spain

* Corresponding authors: ronny.vargas_m@ucr.ac.cr, csune@ipb.csic.es

Table S1: Comparative analysis of BBB penetration by studies of lipid nanoparticles, both unmodified and modified with commonly used materials such as surfactants or PEGylated lipids.

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Kahn et al (111)	NLCs	97.7 ± 1.2 nm; -22 ± 1.5 mV	Carbamazepine	In vivo male Sprague Dawley rats	The brain's AUC of carbamazepine increased by 2,12** when administered encapsulated in NLCs compared to the free drug.	The authors evaluated the anticonvulsant and anxiolytic activity of their carbamazepine-NLCs formulation, and found it more effective than the free carbamazepine dispersion (and comparable to the diazepam control) in the applied models.
Buzyurova et al (135) ¹	SLNs	80 ± 4 nm; -55 ± 1 mV	Pralidoxime	In vivo Wistar rats (both sexes)	The authors claim that SLNs allowed the administration of pralidoxime across the BBB (no comparison with free pralidoxime is provided). The plasma half-life of pralidoxime increased by 3.3-fold with encapsulation.	The formulation effectively reversed the inhibitory effect of organophosphorus agents in the brain, successfully reactivating 36.08 ± 4.3% of brain acetylcholinesterase. Previously reported work from this group found a reactivation of 15% with SLNs of similar composition but without the pegylated lipid (660).
Pavlov et al (130) ²	Liposomes	Specific reported values between: 121 ± 1 nm and 134 ± 1 nm; 46 ± 1 mV and ± 1 mV	i. Rhodamine B ii. Doxorubicin iii. Pralidoxime	In vivo Wistar rats (both sexes)	Surfactant-modified liposomes enhanced BBB penetration of rhodamine B, as shown by un-quantified luminescence observed in rat brain tissue, which is absent when using rhodamine alone. For pralidoxime, brain concentrations following liposome-loaded administration are twice as high compared to the free drug, a difference that decreases over time.	Plasma concentrations of pralidoxime are higher for the free drug at 5 minutes, but the opposite is observed at 10 min. Doxorubicin was only used in release studies, which were also performed with pralidoxime and rhodamine. Pralidoxime-loaded liposomes effectively reverted the inhibitory effect of organophosphorus agents in the brain, successfully reactivating 27% of brain acetylcholinesterase
Lahkar & Kumar Das (131) ²	SLNs	159.90 ± 2.00 nm; -8.91 ± 4.36 mV	Nevirapine	In vivo Male Wistar rat	Compared to unmodified SLNs, Polysorbate 80-modification approximately doubled the brain concentrations of the drug between 1 and 6 hours post-administration. After 24 hours, unmodified SLNs resulted in no accumulation, whereas the surfactant-coated SLNs maintained levels comparable to the peak concentration observed with unmodified NP. In contrast, administration of the free drug resulted in no detectable brain accumulation at any time.	The modification with surfactants increased circulation times of SLNs. The authors demonstrated sustained release of the drug for more than 24 hours.
Liu et al (112)	NLCs ³	Between 110 and 140 nm; Between 5 and 10 mV	siRNA	In vitro bEnd.3 In vivo C57BL/6 mice	The authors found that all their formulations permeated the in vitro BBB model. In the in vivo studies, their formulations were detectable in brain They determined that the different cationic groups in the different ionizable lipids evaluated influenced BBB permeability.	The authors also found that the different cationic groups influenced the siRNA delivery capacity of the NLCs. NLCs formulated with their optimized lipid, characterized by higher permeability and enhanced transfection capacity, were capable of inducing an antitumor immune response and inhibiting tumour growth through the delivery of gene silencing therapies.

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Vijayakumar et al (136) ¹	Liposomes	250.2 ± 9.03 nm; -26.47 ± 0.75 mV	Trans resveratrol	In vivo Charles Foster rats (both sexes)	PEGylated and non-PEGylated liposomes increased the brain concentration of resveratrol between 8.5 and 9 times higher* compared to the free drug. No statistical differences were found between the two types of liposome formulations [†] . Brain concentration of resveratrol was quantified in tissue sample of animals sacrificed 90 minutes after administration.	PEGylation reduced the accumulation of resveratrol in the liver, kidney and spleen compared to non-PEGylated liposomes.
Huang et al (122)	SLNs	117.9 nm; -27.16 ± 1.65 mV	Curcumin	In vivo C57 mice	Encapsulation significantly improved the brain accumulation of curcumin compared with free drug administration. The greatest accumulation was approximately 3-fold* , achieved at 30 minutes.	Their formulation improved the neuron uptake of curcumin. The authors also observed benefits in the expression of apoptosis-related proteins and oxidative damage indicators. In mice, the curcumin-loaded SLNs showed improved results in an open field test on epileptic mice, reduced neuronal loss in a induced seizure model, and regulated apoptotic proteins and neuronal loss in an epilepsy model.
Graverini et al (132) ²	SLNs	262 ± 7.23 m; -36.0 ± 4.12	Andrographolide	In vitro hCMEC/D3 In vivo Wistar rats	In vitro results showed that the apparent permeability coefficient achieved with SLNs was about 3-fold higher than that observed for free andrographolide. In the brain tissue of sacrificed rats, a substantial but unquantified presence of SLNs was observed 24 hours post-injection. This accumulation diminished after 72 hours.	The authors evaluated the chemical and physical stability of the SLNs suspension and lyophilized formulation.
Gomes et al (123)	SLNs ⁴	137.3 ± 3.2 nm; -10.0 ± 1.0 mV	SiRNA	In vitro Phospholipid vesicles	The encapsulation increased SiRNA permeability across vesicles by approximately 1.86-fold*** . Permeability calculations were performed by fluorescent analysis of abluminal chamber over 5-hour period.	In this publication, the authors developed their own non-cellular based BBB model. This model is based in phospholipid vesicles due to their structural similarity with cellular membranes. Their model was tested using both lipid and polymeric nanoparticles, with the former demonstrating a higher enhancement in permeability. The study did not include any cross-testing with other validated methods.
Makhdoom et al (124)	NLCs	239.7 ± 4.04 nm; - 16.33 ± 0.15 mV	Silibinin	In vivo Mice (male)	Encapsulation in NLCs lead to a 5.7-fold*** increase in the silibinin concentration in brain samples after 30 days of treatment.	In a model of induced cognitive impairment, the treatment with silibinin-loaded NLCs reduced neurotoxicity and oxidative stress, as observed in behavioural and histopathological evaluations.
Mante et al (125)	SLNs	152.4 ± 16.3 nm; -13.2 ± -1.2	Cryptolepine	In vitro PAMPA In vivo Zebra fish	Encapsulation of cryptolepine in SLNs increased permeability in the PAMPA model by about 33-fold , after 18 hours of incubation.	For efficacy testing, the authors applied a model of seizures induced by pentylenetetrazole. They found that their formulation significantly reduced the seizure score, as observed through certain swimming behaviours described by the authors.

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Esposito (133)(661) ²	SLNs	Between 185 and 300 nm Zeta potential was not reported	Dimethyl fumarate	In vitro bEnd3 In vivo Athymic mice	In the in vitro model, the presence of DDAC surfactant increased SLNs permeability by 1.55 -fold compared to SLNs without this modification. P80 surfactant did not improve permeability. Permeability calculations were obtained from the fluorescent intensity of SLNs measured in both luminal and abluminal chambers over a 2-hour period. The SLNs containing P80 were evaluated in the in vivo model. The authors found that SLNs were able to reach the brain after intraperitoneal or intranasal administration, as observed by fluorescence luminescent imaging 4 hours after administration.	
He et al (126)	SLNs	128.4 ± 6.8 nm; -3.07 ± 0.08mV	β-elemene	In vivo BALB/c nude mice, ICR mice and Sprague Dawley Rats (male)	The AUC of brain β-elemene in rats was 1.62 times higher after administration in SLNs compared to free drug. The plasmatic AUC of β-elemene was also improved by SLNs in both mice and rats.	The anti tumour capacity was evaluated in a BALB/c nude mice model. The treatment with β-elemene encapsulated in SLNs caused a suppression in tumour growth and extended survival times compared to the free drug. The tolerability of the vehicle was demonstrated in an acute toxicity model in ICR mice.
Ebrahimi et al (127)	SLNs	Around approx. 290 nm; between -5.25 ± 1.2 and 4.55 ± 0.05 mV	Metformin	In vivo Rats	The brain's AUC of encapsulated metformin increased by 2.15 -fold*** compared to free metformin.	Encapsulation also increased plasma concentrations of the drug. In a traumatic brain injury model, the formulation proved to attenuate brain edema and BBB disruption. It also showed better scores in neurological and behaviour assessment after the induced brain injury, compared to free drug.
Marinelli et al (662)(128)	SLNs	208.2 ± 10.74 nm; -27.9 ± 0.47	Capsaicin extract	In vitro PAMPA	In the PAMPA model, the encapsulation of the capsaicin extract in SLNs increased its permeability by about 2.28 -fold, after 18 hours of incubation.	The authors evaluated the antioxidant protective effects of the formulation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, showing promising results in reducing reactive oxygen species.
Pandian et al (129)	SLNs	113 nm Zeta potential was not reported	Rutin	In vivo Male <i>Rattus norvegicus</i> rats	Free rutin administration did not reach detectable brain concentration levels. In contrast, rutin-SLNs showed increasing quantities of the drug in the brain. Higher accumulation was observed at 54 hours after administration, when the brain concentration reached about 15%.	The authors evaluated the kinetics of drug release and the stability of their formulation. They also evaluated the molecular docking and binding interactions of rutin with target proteins.

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Meng et al (134) ²	NLCs	90.50 ± 0.2 nm; -20.39 ± 0.89 mV	Curcumin	In vivo Sprague Dawley Rats	The fluorescence intensity in the brain from the NLCs loaded with a fluorescent dye increased nearly 2.35* times with the superficial modification with PS80 surfactant. Tissue samples were analysed from animals sacrificed 12 hours after administration.	The authors optimized the lipid ratio and surfactant content based on the physicochemical properties and stability of the nanoparticles. They evaluated plasma stability, hypothesizing that LDL lipoproteins might be absorbed on the surface of NLCs containing PS80 surfactant. However, they indicated that additional research is necessary to clarify the mechanisms. They also found that the PS80 coating enhanced cellular uptake by B.end3 cells and macrophages. PS80-coated NLCs maintained a similar distribution among other tissues, with the spleen showing the highest accumulation among the evaluated organs.
Kumar et al (113)	SLNs and NLCs	SLNs 74.61 ± 4.23 nm; -7.7 ± 0.4 mV NLCs 67.46 ± 3.29 nm; -8.9 ± 0.5 mV	i. Quercetin ii. Ascorbic acid	In vivo Male wistar rats	Biodistribution assays showed that after 24 hours, SLNs increased brain delivery of quercetin by 3.2-fold* , and NLCs by 5.6-fold* , compared to the free drug. The highest accumulation of quercetin was found in the brain, compared to that in the liver, heart, and kidney	The in vitro anti-oxidant activity of quercetin and ascorbic acid was increased with encapsulation in SLNs and NLCs. Treatment with SLNs and NLCs significantly reduced free radicals in an induced in vivo model of oxidative stress.
Gadgil et al (114)	NLCs	172.3 ± 3.54 nm; -4.54 ± 0.87 mV	Lazaroid	In vivo Rats	Brain concentrations of lazardoid with NLCs formulation were about 6.8 times higher* than free drug about 4 hours after injection. The authors also attributed a lower liver uptake for the drug in the NLCs formulation.	The haemolytic potential of lazardoid after intravenous administration is lower, when administered encapsulated in NLCs. The authors applied a design of experiments approach for rational optimization of the formulation.
Ghasemian et al (115)	SLNs and NLCs	127 ± 5 nm; -16 V	Baclofen	In vivo Sprague Dawley Rats	Two hours after administration, the brain concentration of baclofen with NLCs was 1.46 times higher than that obtained with the free drug.	The authors also prepared and characterized SLNs; however, NLCs were the only type of formulations evaluated in vivo. The characterization included assessing the physicochemical properties before and after lyophilization.
Nasir et al (116)	SLNs	About 55.20 nm; Zeta potential was not reported	Temozolomide	In vivo Sprague Dawley Rats	The administration of temozolomide in nanoencapsulation increased brain concentrations of the drug approximately 6-fold* at 2 hours after administration, approximately 2-fold* at 4 hours, and nearly 1.2-fold at 6 hours.	In an animal model of tumour induction, animals treated with temozolomide-SLNs showed a considerable decrease in tumour size, compared to those administered free temozolomide, with a significant downregulation of inflammatory markers. The authors also demonstrated the effectiveness of the encapsulated drug against chemotherapy- resistant cells.
Arduino et al (118)	SLNs	86 ± 2 nm; -26.3 ± 0.4 mV	Kiteplatin	In vitro hCMEC/D3	Different formulations proved to pass the BBB cellular model.	The authors evaluated cellular cytotoxicity and cellular uptake on U87-MG cells

Study	Type of lipid nanoparticle	Particle size; Zeta potential	Drug	BBB model	Changes in NP or drug distribution	Other results
Rubab et al (117)	NLCs	147.8 ± 10.4 nm; −32.8 ± 1.4 mV	Curcumin	In vivo Sprague Dawley Rats	The authors argue that their formulation increased the delivery of curcumin to the brain.	Authors studied the in vivo antidepressant and anxiolytic activity of the formulations. Their results of higher struggling times in two models of induced behavioural deficit on rats (forced swim test and tail suspension test) suggested an enhancement of the antidepressant effect of free curcumin, compared to the drug administered in NLCs. On a similar way, the higher anxiolytic effect of the encapsulated curcumin was demonstrated by higher exploration times in a light-dark box rat model. In models simulating neurodegeneration and neuroinflammation, curcumin-loaded NLCs demonstrated superior neuroprotective and anti-inflammatory outcomes, as observed in histopathological evaluations and oxidative stress indicator quantifications.
Zwain et al (119)	NLCs	123.3 ± 0.642 nm; −32.4 ± 0.967 mV	Docetaxel	In vitro HMBEC, HBVP and HA	The results demonstrated permeation of formulations through evaluation of transendothelial electrical resistance.	Authors find that the composition of the NLCs affects the BBB permeability, and the integrity of the barrier itself. They also performed a short-term and long-term stability evaluation. They also evaluate internalization mechanisms. The docetaxel-loaded NLCs prove an enhanced anti-tumour efficacy in tumour spheroids of U87 MG cells.
Chen et al (120)	Calcium phosphate lipid nanoparticle	31.0 ± 2.2 nm; −4.97 ± 0.01 mV	Antisense oligonucleotides (superoxide dismutase)	In vivo Zebra fish	Authors demonstrated the diffusion of the nanoparticles to the brain and spinal cord after direct injection.	A time-dependent cellular uptake of the nanoparticles by neuron-like cells was demonstrated, and successfully achieved gene silencing. This has demonstrated by the knockdown the superoxide dismutase
Rojekar et al (121)	NLCs	351.7 ± 3.36 nm −20 ± 2.3 mV	Etravirine	In vivo Sprage-Dawley rats (female)	This study was not intended to deliver to the brain, but in their observations they found that encapsulation increase brain accumulation of 4.2 , 1 hour after administration.	Systemic AUC were 1.77 higher with encapsulation, and higher accumulations was also observed in ovary, lymphatic nodes, spleen, lung, liver and Kidney. Particularly, at one hour, kidney showed the highest accumulation among all observed organs.

Notes:

Abbreviations: AUC: Area under the curve; BBB: Blood-brain barrier; Bend.3: Brain endothelial cells derived from mice; DDAC: Didecyltrimethylammonium chloride; hCMEC/D3: Human cerebral endothelial cells; LDL: Low-density glycoprotein; NLCs: Nanostructured lipid carrier; PAMPA: Parallel artificial membrane permeability assay; SiRNA: Small interfering ribonucleic acid; SLNs: Solid lipid nanoparticle.

Reported statistically significant permeability improvements (p value: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001; § < 0.0001).

† Authors report no statistically significant change in permeability (p value ≥ 0.05).

- 1- Authors identified their formulation as PEG lipid-surface modified nanoparticles/liposomes .
- 2- Authors identified their formulation as surfactant-surface modified nanoparticles/liposomes.
- 3- This study conducted a screening of a series of different ionizable lipids synthesized by the authors, each featuring different ionizable amine groups.
- 4- Authors also evaluated polymeric nanoparticles.
- 5- Reference numbers correspond to the references in the main article

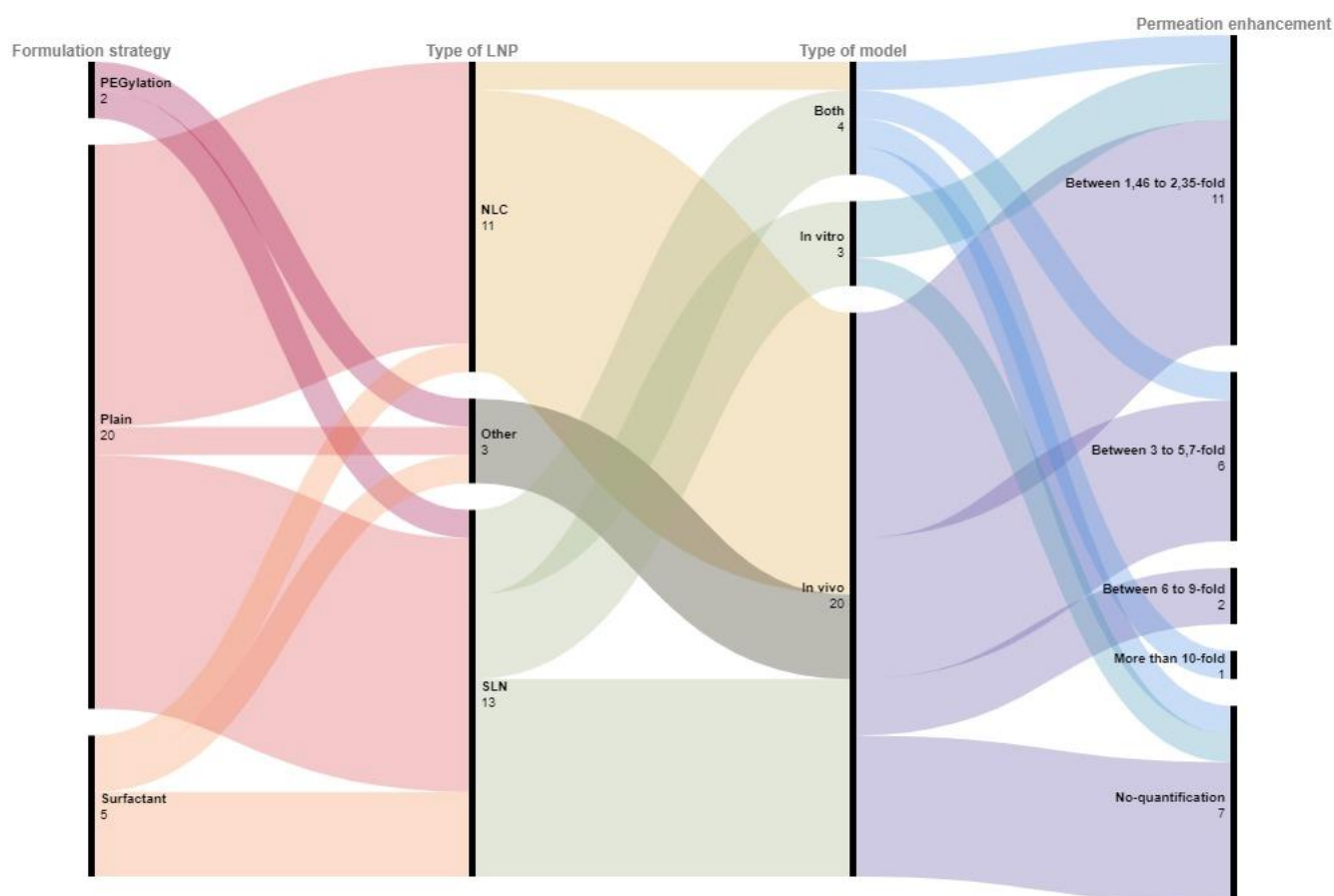


Figure S1. Graphical illustration of the distribution of studies with lipid nanoparticles unmodified or modified with regularly used materials such as surfactants or PEGylated lipids. Each column of the alluvial diagram represents a different aspect of key study features: design of the LNPs (formulation strategy and type of LNPs), the type of model in the evaluation strategy, and the permeation enhancement results. Each column is divided into the corresponding categories. The flows between columns illustrates the connections and transitions between each category, and the height of the transition block corresponds to the quantity of studies at a specific point of the flow. This diagram provides a comprehensive view of the relationships between formulation strategies, types of LNPs, testing models, and permeation outcomes, offering insights into trends and patterns within these data sets.

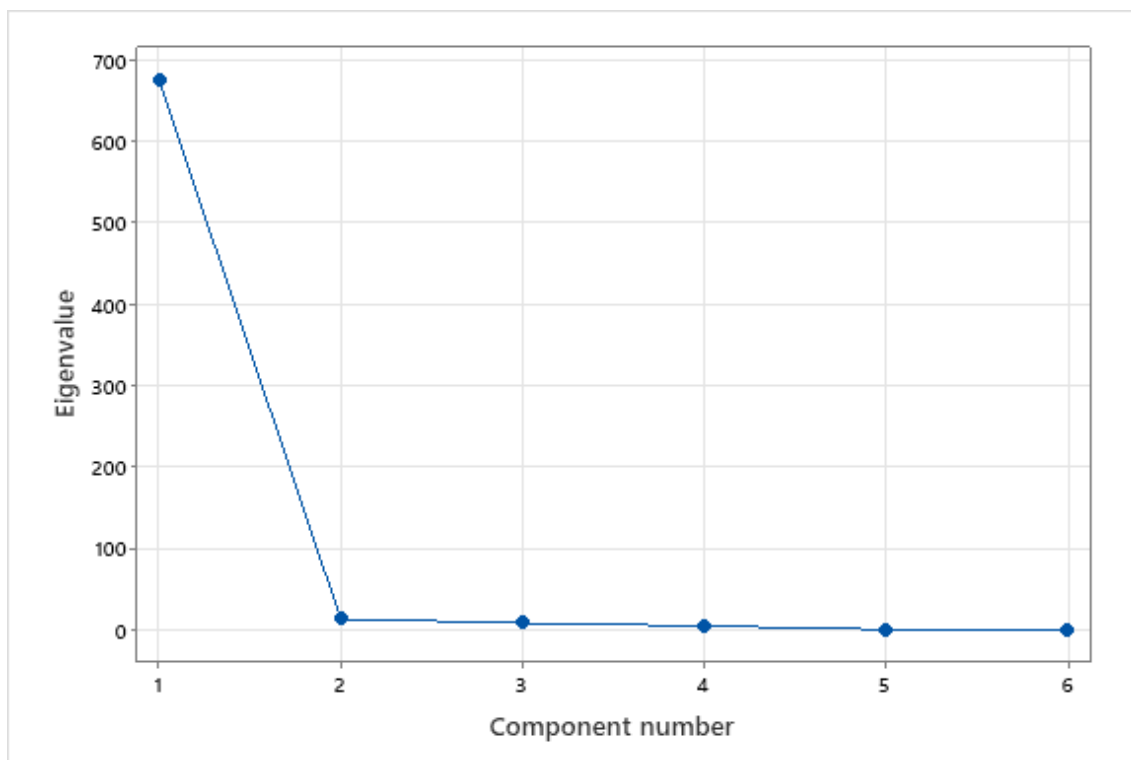


Figure S2. Scree plot for principal component analysis of studies with permeation enhancement ratio. Principal component analysis included permeation enhancement ratio, particle size, zeta potential, type of lipid nanoparticle, category of functionalization, and type of model (*in vivo* or *in vitro*). Eigenvalues almost form a straight line from the second component (cumulative eigenvalue of 0,981), indicating that the first two components explain an adequate amount of variation in the data.

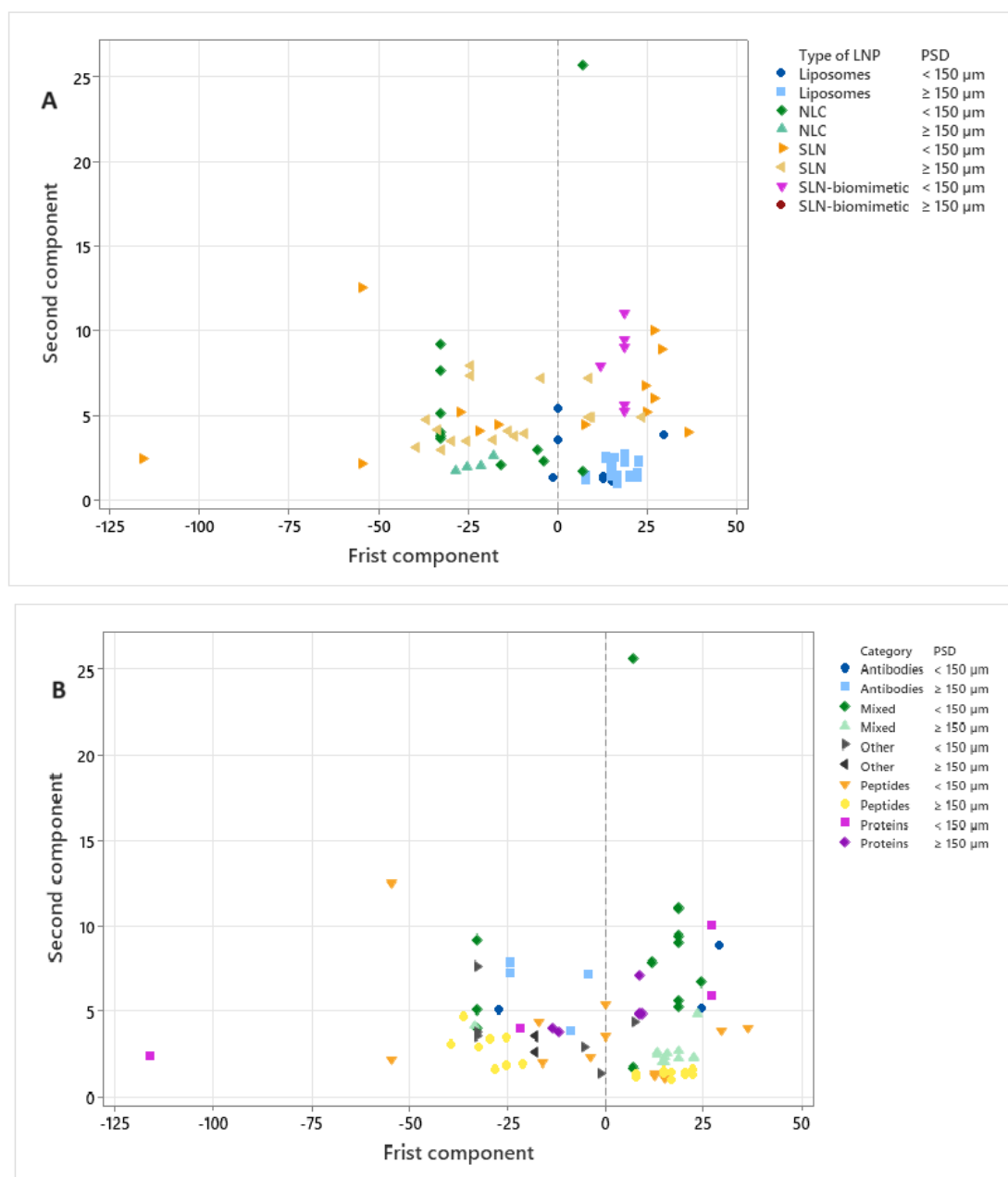


Figure S3. Score plot for principal component analysis of studies with permeation enhancement ratio. Principal component analysis included permeation enhancement ratio, particle size, zeta potential, type of lipid nanoparticle, category of functionalization, and type of model (*in vivo* or *in vitro*). The aggrupation of the coefficients from the two first components by particle size and type of lipid nanoparticle (Figure S3-A), or category of functionalization (Figure S3-B), reveals data clusters indicating data distribution around those variables.

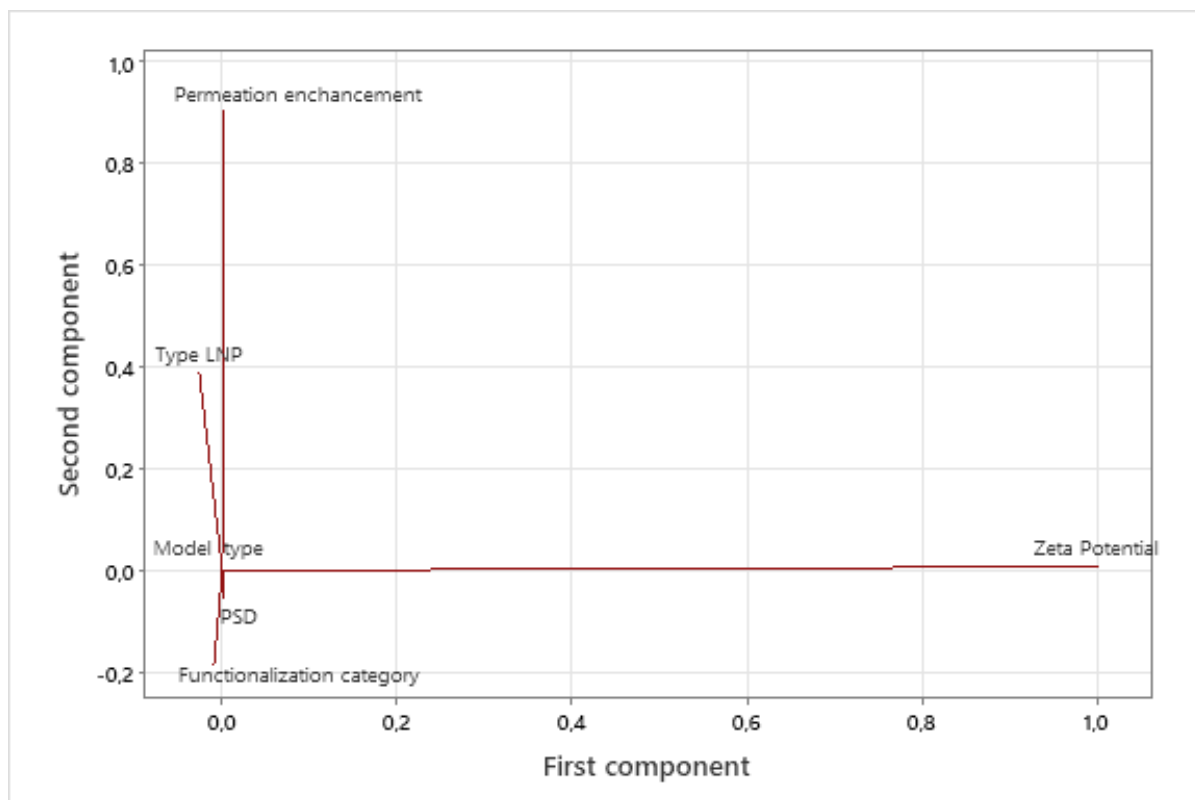
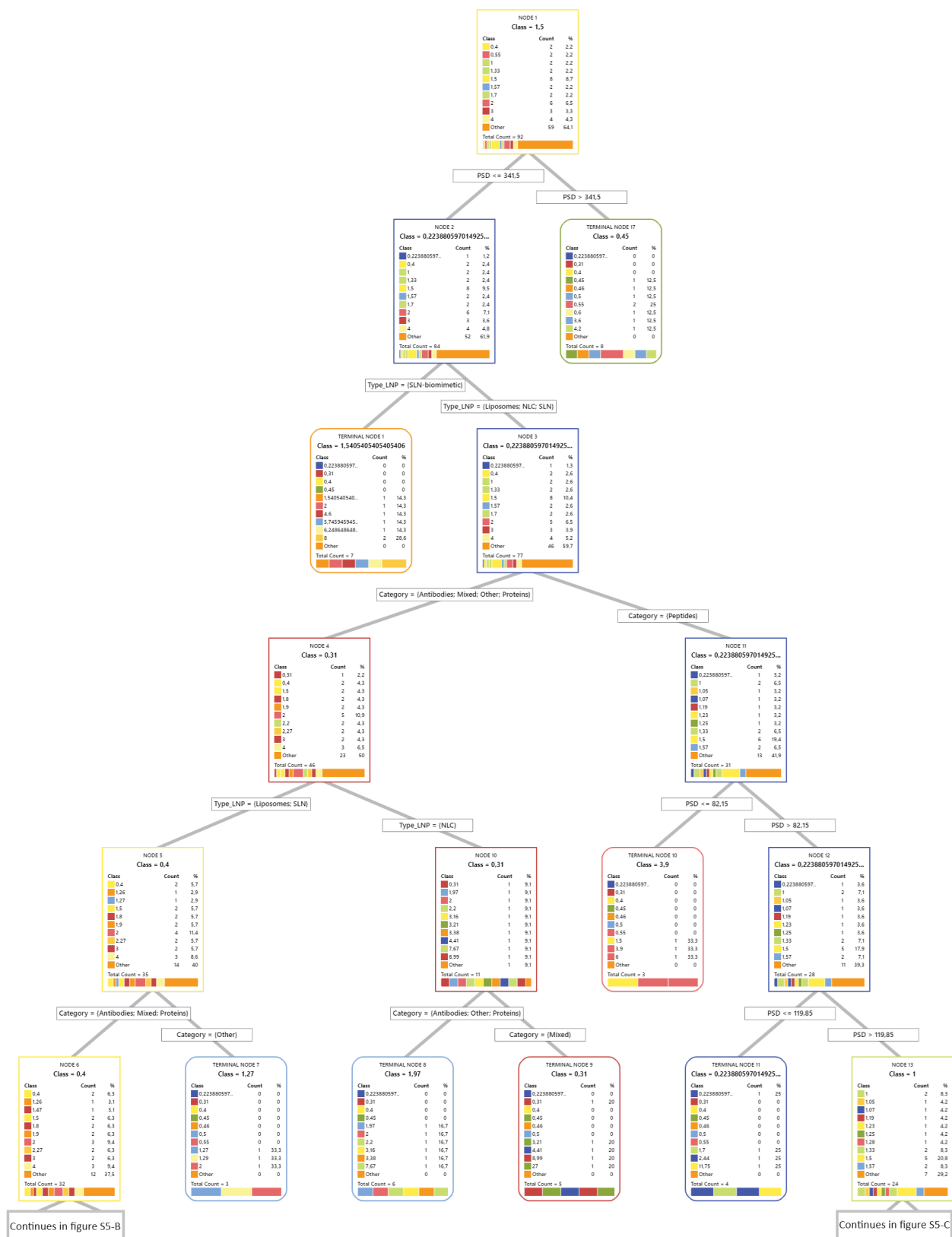


Figure S4. Loading plot for principal component analysis of studies with permeation enhancement ratio. Principal component analysis included permeation enhancement ratio, particle size, zeta potential, type of lipid nanoparticle, category of functionalization, and type of model (*in vivo* or *in vitro*). The orientation of the vectors indicates effects of the type of LNP, functionalization category, and particle size on the permeation enhancement. The orientation of the zeta potential vector with respect to permeation enhancement (perpendicular) indicates weak influence of the variable.



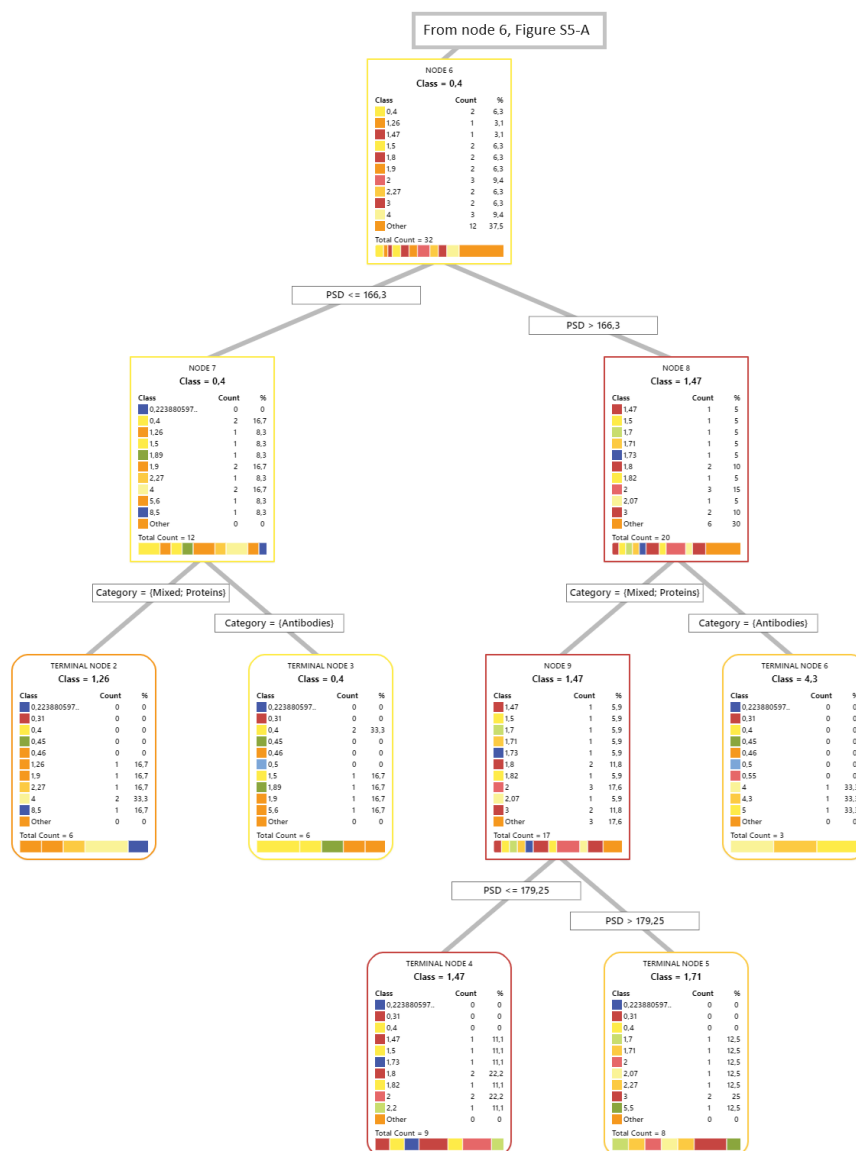


Figure S5-B: Classification and Regression tree (CART®) for permeation enhancement ratio, particle size, type of lipid nanoparticle and category of functionalization, nodes 6 to 9, and terminal nodes 2 to 6 (continued from Figure S6-A, continued in Figure S6-C)



Figure S5-C: Classification and Regression tree (CART®) for permeation enhancement ratio, particle size, type of lipid nanoparticle, and category of functionalization, nodes 14 to 16, and terminal nodes 12 to 16 (continued from Figure S6-A). The type of lipid nanoparticle results in fewer nodes and less distinct categories within the regression tree compared to the other two variables. Notably, node 2 splits into the type of lipid nanoparticle of “SLNs-biomimetic” in one branch and the rest of LNPs in the other, which reflects the differential behaviour in terms of permeation enhancement of that type of LNPs. Particle size emerges as the most important predictor (see also Figure S7) evident in most data splits.

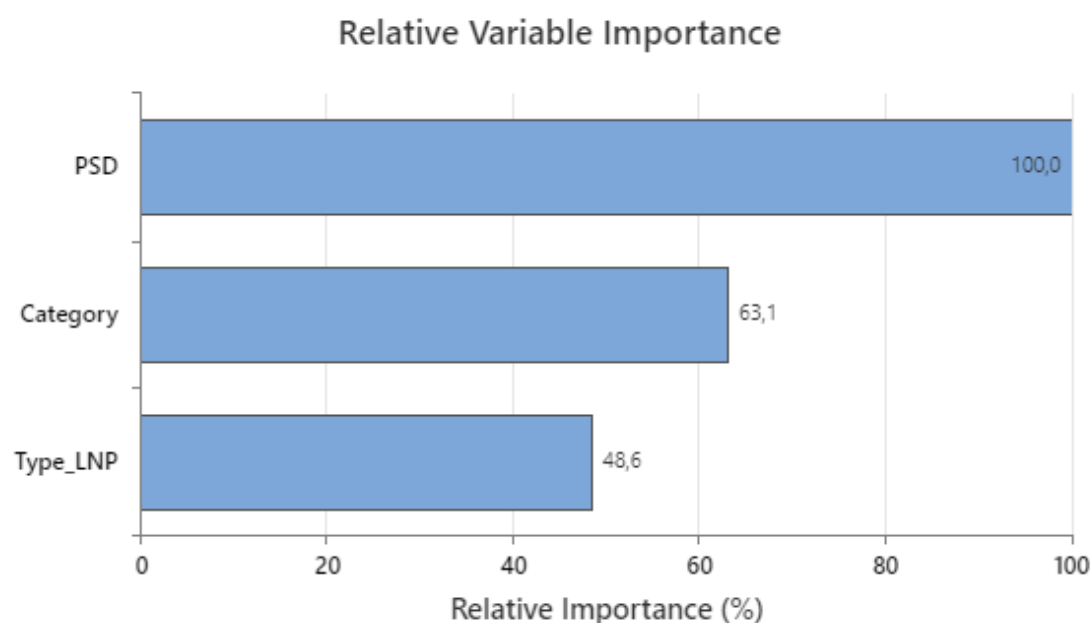


Figure S6. Chart of relative variable importance for the Classification and Regression tree (CART®) for permeation enhancement ratio, particle size, type of lipid nanoparticle, and category of functionalization. For the analyzed dataset and the performed classification, particle size distribution (PSD) is the variable with the highest improvement score to identify important patterns and is the most relevant predictor in this classification tree. Relative to PSD, the category of functionalization and the type of lipid nanoparticle are the second and third more relevant variables to predict data distribution.

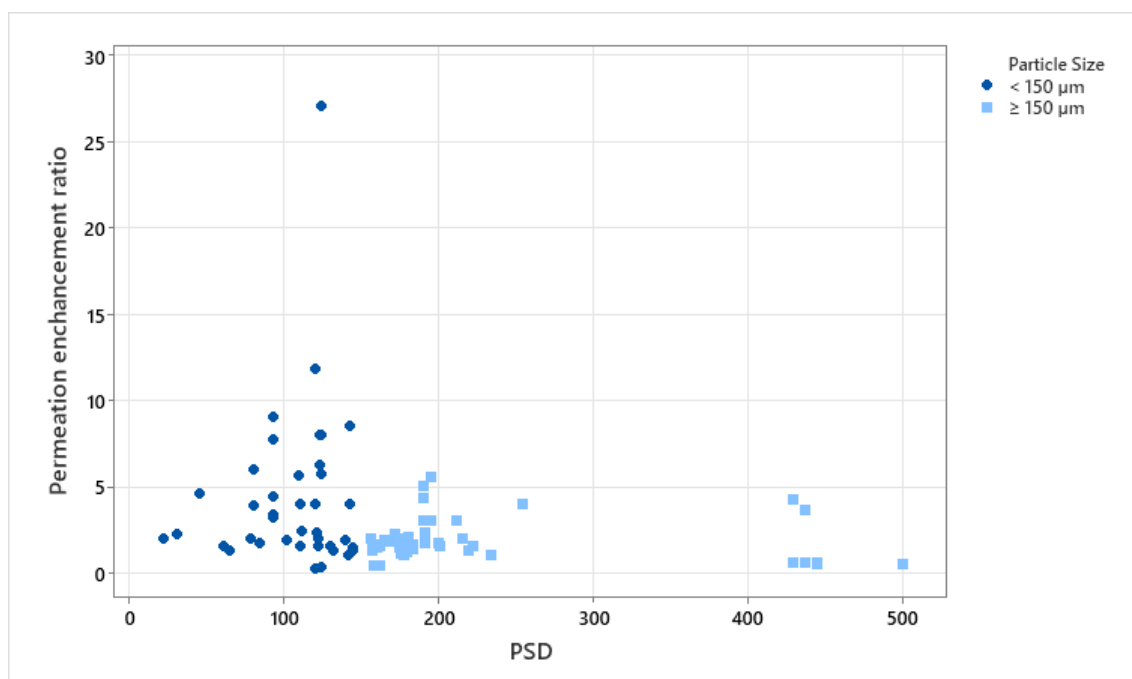


Figure S7. Scatterplot for particle size and permeation enhancement ratio. Graphical representation of data allowed the identification of the particle sizes threshold where permeation enhancement trends shift. An analysis of variance confirmed the significant differences between the groups, with a p-value < 0.0001

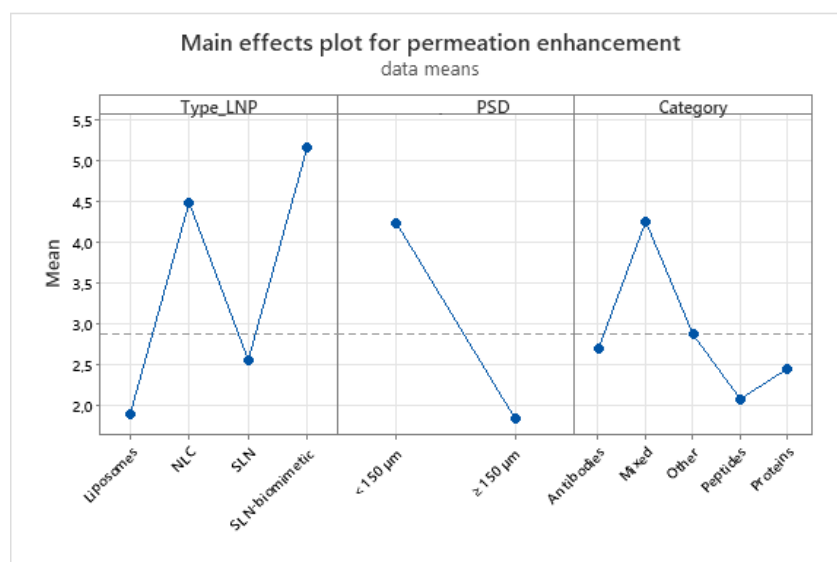


Figure S8. Main effects analysis of permeation enhancement ratios. This figure presents the effects of particle size, functionalization category, and lipid nanoparticle type on permeation enhancement ratios. The analysis demonstrates varying responses across different variable categories, highlighting higher permeation enhancements in NLC and biomimetic systems by type, mixed strategies within functionalization categories, and nanoparticles smaller than 150 μm .

Anexo 3: Participación en congresos

13th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology

Critical process parameters identification of the LNP microfluidic manufacturing process for siRNA delivery

Rotterdam, Países Bajos, 28/03/2022 – 31/03/2022

Critical process parameters identification of the LNP microfluidic manufacturing process for siRNA delivery

Ronny Vargas^{1,2}, David A. Narváez-Narváez¹, Anna Nardí-Ricart¹, Débora Mercadé-Frutos¹, Pilar Pérez-Lozano^{1,3}, Encarna García-Montoya^{1,3}, Josep M^o Suñe-Negre^{1,3}, Cristina Hernández-Munain⁴, Carlos Suñe⁴, Marc Suñe-Pou^{1,3}

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain, rvargas20@alumnes.ub.edu.

² Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Costa Rica, San José, Costa Rica.

³ Pharmacotherapy, Pharmacogenetics and Pharmaceutical Technology Research Group Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain.

⁴ Departments of Molecular Biology and Cell Biology and Immunology, Institute of Parasitology and Biomedicine "López-Neyra" (IPBLN-CSIC), Granada, Spain.

Introduction

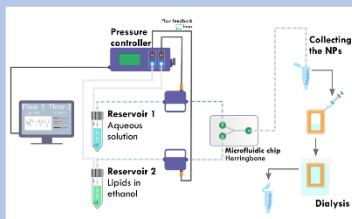
Delivering small interfering RNA (siRNA) enables specific gene silencing, opening a wide range of therapeutic possibilities^{1,2}. However, the siRNA must reach its target without any disruption of its sequence³. For that purpose, some evidence positions lipid nanoparticles (LNP) as the most clinically advanced non-viral vectors for siRNA delivery⁴. Commonly reported critical quality attributes (CQA) affecting the physicochemical and biological performance of LNP are particle size distribution (PSD), encapsulation efficiency, polydispersity index (PDI), morphology, surface charge, as well as stability and drug release⁵⁻⁷.

Reducing the complexity of manufacturing siRNA loaded-LNP is probably one of the most important factors for their feasibility of large-scale production and therapeutic translation^{2,8}. Production methods based on rapid microfluidic mixing (MFM) of ethanolic solutions of lipids and aqueous buffered solutions of siRNA at microfluidic scale with the aid of a flow control mechanism, allows obtaining small and uniform LNP with high efficiency of siRNA entrapment^{4,9,10}.

In this work, we developed LNP for RNA delivery with a Quality by Design (QbD) approach for preliminary screening of microfluidic manufacturing conditions to identify critical process parameters (CPP), broadening the design space typically explored in the previously reported literature.

Experimental

LNP Production



DoE Design

Factors	Level -1	Level +1
A	Total Flow	300 µL/min
B	Flow Rate Ratio	3
C	Dialysis	No Dialysis

Table 1. Factorial design on LNP preparation DoE

Factors	Level -1	Level 0	Level +1
D	Aqueous Phase	0	NA
E	Dialysis	0	0,1 mM

Table 2. Factorial design on KCl concentration for LNP preparation

LNP Characterization

Particle size distribution (PSD), Polydispersity Index (PDI), Surface charge and Particle morphology.

Results

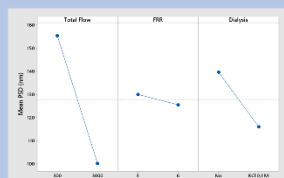


Figure 1. TF, FRR and D main effects diagram for PSD.

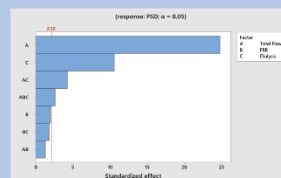


Figure 2: Pareto Chart for standardized effects for PSD.

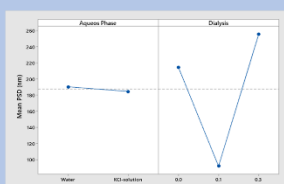


Figure 3: Diagram of main effects of KCl composition for PSD.

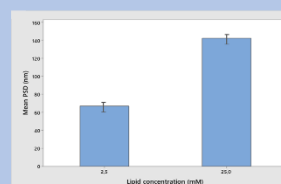


Figure 4: Effect of lipid concentration on PSD (screening tests prior to DoE).

Conclusion

We identified CPP that allowed us to hypothesize that some factors, such as dialysis process and lipid concentration, could have a greater impact on LNP CQA than typically tested manufacturing conditions. Our results suggest that dialysis is key to achieving batch-to batch reproducibility.

With this information, we designed a manufacturing method without any size reduction step, which provides reproducible and stable LNP of a mean size of 67.79±4.57 nm, which is a candidate for biological optimization to deliver siRNA across biological barriers.

References

1. *Genes (Basel)*, 8 (3), (2017).
2. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 160:159-67 (2019).
3. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 154: 64-78 (2020).
4. *Small Methods*, 2(9):170378 (2018).
5. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 10(3):66-80, (2020).
6. *J. of Pharm. and Biomed. Analysis*, 192 p. 113842 (2021).
7. *Pharmaceutics*, 10(2):1-17, (2018).
8. *Int. J. Pharm.*, Apr 15:559-120464, (2021).
9. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 128:84-100 (2018).
10. *Int. J. Pharm.*, Apr 15:579-119187 (2020).

Lipid nanoparticles functionalization strategies to cross the blood-brain-barrier

Ronny Vargas^{1,2}, David Narváez- Narváez¹, Cristina Moreno-Castro³, Anna Nardi-Ricart¹, Pilar Pérez-Lozano¹, Encarna García-Montoya¹, Josep María Suñé-Negre¹, Cristina Hernández-Munain³, Carlos Suñé³, Marc Suñé-Pou¹

¹University of Barcelona, Av. de Joan XXIII, 27-31, Barcelona, Spain

²Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica

³Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (IPBLN-CSIC), Av del Conocimiento 17, Granada, Spain

INTRODUCTION

Brain diseases are a mayor public health concern worldwide [1,2]. The blood-brain-barrier (BBB) acts as a protective shield, preventing the direct exposure of the central nervous system (CNS) to pathogens and toxic substances [1], as well as therapeutic substances. Therefore, the BBB is an obstacle to treat many brain diseases [3-5].

Nanotechnology-based drug delivery strategies have become an opportunity to take advantage of endogenous transport mechanisms of the CNS without compromising the BBB structure or functionality [4,5]. The modification of lipid nanoparticles (LNP) and other nanocarriers with superficial moieties (such as antibodies or peptides) allows stimulating and exploiting the transport mechanisms expressed on BBB [6,7].

A systematic review was carried out to compile the functionalization strategies used in academic works, and to evaluate which studies have provided evidence on the effectiveness of brain targeting.

This work is part of a research project that aims to deliver small interfering ribonucleic acid (siRNA) through the BBB, with LNP.

METHODOLOGY

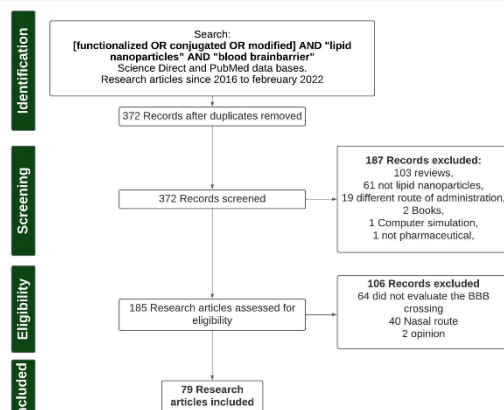


Figure 1. Flow diagram of the systematic review.

RESULTS

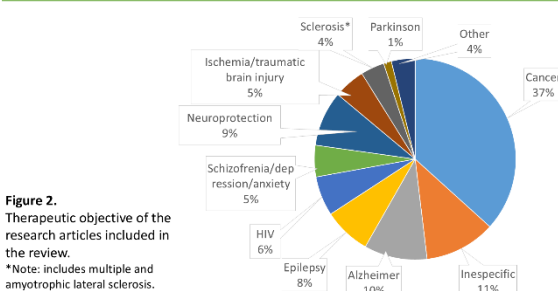


Figure 2. Therapeutic objective of the research articles included in the review.

*Note: includes multiple and amyotrophic lateral sclerosis.

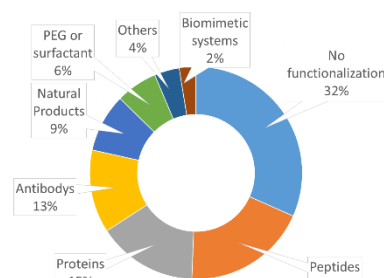


Figure 3. Lipid nanoparticle modification strategies to cross the BBB

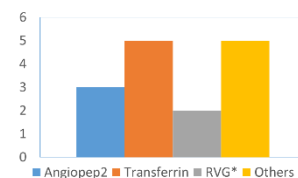


Figure 4. Peptide-based functionalization strategies to cross the BBB.

*Note: rabies virus glycoprotein

Table 1. Active pharmaceutical ingredients most commonly delivered for the therapeutic objectives described in Figure 2.

Drug	Number of papers ¹
Curcumin	7
Docetaxel, Resveratrol	5
Doxorubicin, Etoposide	4
Quercetin	3
Dimetil fumarate, Nevirapine, Placitaxel	2

Note: 1- There are 34 more drugs appear in 34 different papers.

Table 2. Evaluation strategies for BBB crossing

Type of study	Number of papers
In vivo studies	34
In vitro studies	35
In vivo + in vitro studies	10

CONCLUSIONS

- Peptides are the most common functionalization strategy for LNP to deliver into the BBB.
- There are a significant amount of research work that evaluate BBB passage of un-functionalized LNP.
- Evaluation strategies should include comparisons with unfunctionalized LNP to determine the success of a particular modification approach.
- The research work on functionalized LNP for brain delivery includes a wide range of therapeutic objectives and active pharmaceutical ingredients.



XVI Congress of the Spanish Society of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology

Formulación de nanopartículas lipídicas para la vehiculización de siRNA para el silenciamiento de TCERG1 en células HEK 293T

Madrid, España, 11/01/2023 – 13/01/2023

Formulación de nanopartículas lipídicas para la vehiculización de siRNA para el silenciamiento de TCERG1 en células HEK 293T



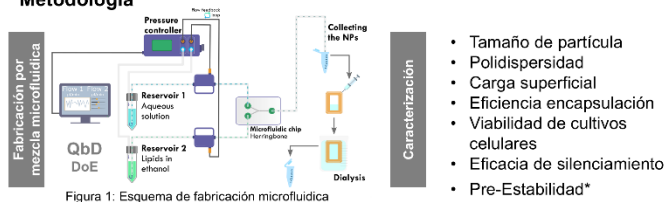
VARGAS, Ronny^(1,2), MORENO-CASTRO, Cristina⁽³⁾, NARDI-RICART, Anna⁽¹⁾, PÉREZ-LOZANO, Pilar^(1,4), GARCÍA-MONTOYA, Encarna^(1,4), SUNÉ-NEGRE, Josep Maria^(1,4), HERNÁNDEZ-MUNAIN, Cristina⁽⁵⁾, SUNÉ, Carlos⁽³⁾, SUNÉ-POU, Marc^(1,4).

(1) Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y Físicoquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, España. (2) Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. (3) Departamento de Biología Molecular, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (IPBLN-CSIC), Granada, Spain. (4) Grupo de Investigación en Farmacoterapia, Farmacogenética y Tecnología Farmacéutica, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Barcelona, España. (5) Departamento de Biología Celular e Inmunología, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (IPBLN-CSIC), Granada, Spain.
Contacto: ronny.vargas_m@ucr.ac.cr

Introducción

Las nanopartículas lipídicas (LNPs) son formas farmacéuticas versátiles con un amplio rango de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, tanto de pequeñas moléculas como para ácidos nucleicos [1]. Poseen una elevada biocompatibilidad, capacidad protectora, y son aptas para el direccionamiento activo y pasivo [2]. El uso de LNPs para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) es un campo de investigación en crecimiento [3]. La presente comunicación forma parte de un proyecto de investigación que busca transportar siRNAs a través de la BHE, para desarrollar terapias de silenciamiento. Es un primer paso de formulación del vehículo y la evaluación de su aptitud biológica y capacidad de silenciamiento.

Metodología



- Tamaño de partícula
- Polidispersidad
- Carga superficial
- Eficiencia encapsulación
- Viabilidad de cultivos celulares
- Eficacia de silenciamiento
- Pre-Estabilidad*

Técnicas analíticas

- Dispersión dinámica de la luz
- Electroforesis de láser Doppler
- Microscopía confocal
- Citometría de flujo
- Western blot
- qPCR

Resultados

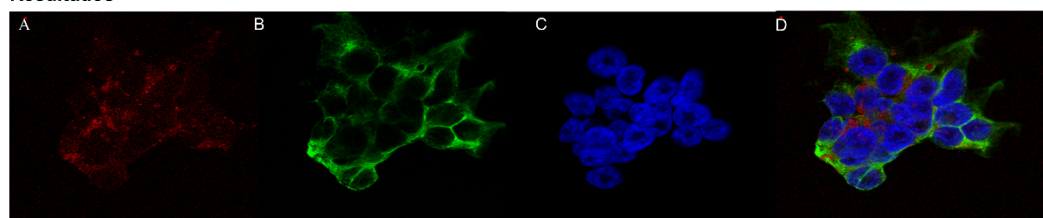


Figura 2: Microscopía confocal de las LNPs en contacto con células HEK293T. A) Distribución de las LNP (rojo). B) Disposición de la tubulina (citoplasma, verde). C) Tinción de ácidos nucleicos (núcleo celular, azul). D) Imagen completa de la ubicación del citoplasma, núcleo celular y LNPs

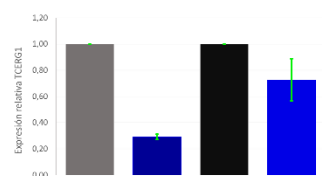


Figura 3: Efecto de las LNPs en la expresión relativa de la proteína humana TCERG1 (azul brillante) y comparación con control positivo (azul oscuro) y control negativo (negro).

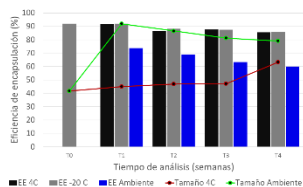


Figura 4: Estabilidad de las LNPs. Las barras muestran la eficiencia de la encapsulación (eje izquierdo), y las líneas muestran el tamaño de partícula (eje derecho).

Conclusiones

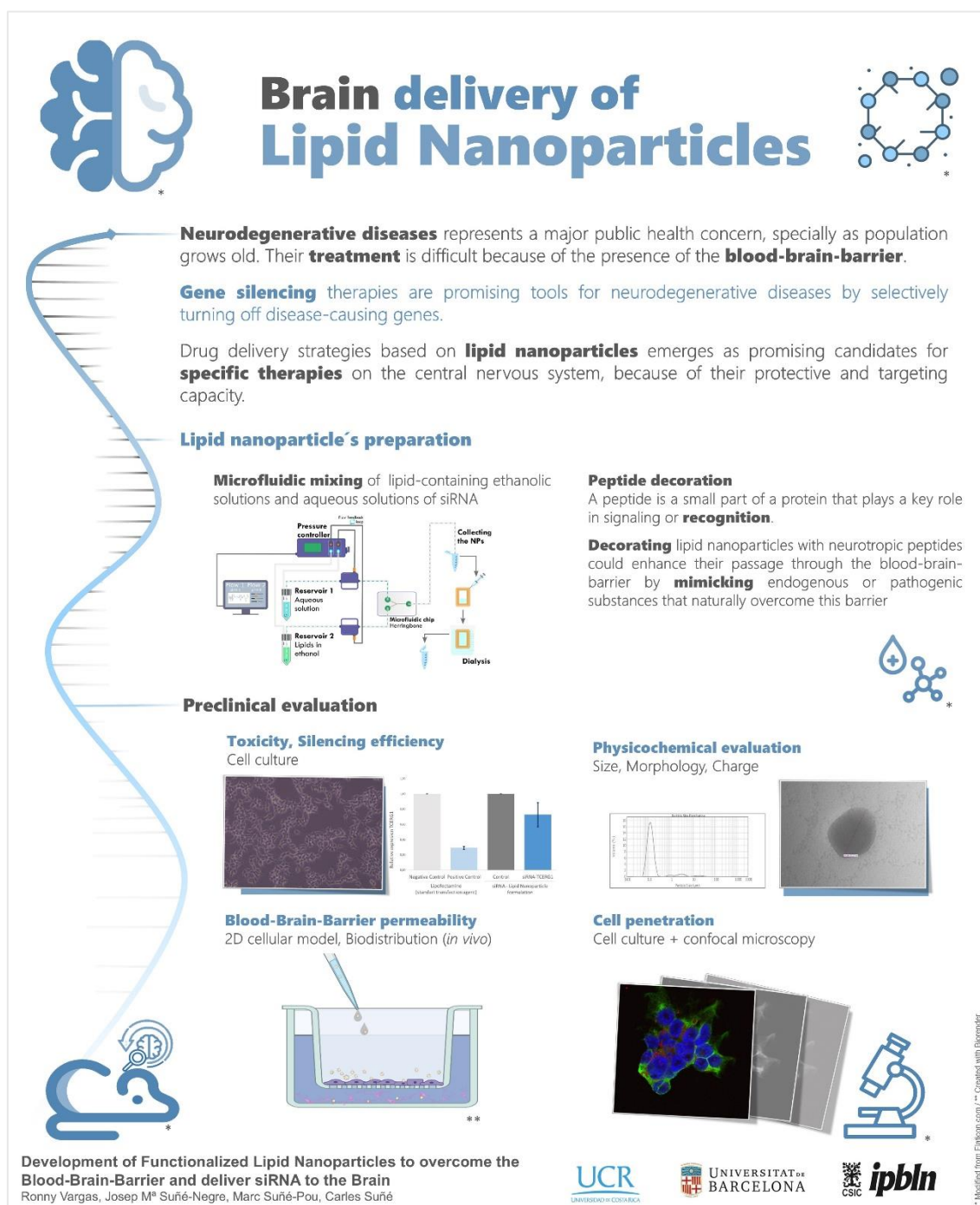
El enfoque de QbD permitió obtener LNPs que permiten el transporte y liberación de siRNAs al interior de células HEK293T, observándose un efecto de silenciamiento génico.

Las LNPs poseen una estabilidad de, al menos, 3 semanas a 4 °C, y son una buena opción para que, a través de la incorporación de derivados peptídicos en su superficie, dirijan biofármacos a través de la BHE.

LERU Summer school – Concepts of intervention science applied to global challenges

Brain delivery of Lipid Nanoparticles

Heidelberg, Alemania, 02/07/2023 – 08/07/2023



14th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology

Preparing for Blood-Brain Barrier Penetration: A Study on the Preparation of Peptide Functionalized Lipid Nanoparticles for the Treatment of Brain Diseases

Viena, Austria, 18/03/2024 – 21/03/2024

Preparing for Blood-Brain Barrier Penetration: A Study on the Preparation of Peptide-Functionalized Lipid Nanoparticles for the Treatment of Brain Diseases

Ronny Vargas^{1,2}; Kevin Valencia-Clua¹; Alejandro Benítez-Troncoso³; Noelia Martínez-Martínez³; David A. Narváez-Narváez¹; Pilar Pérez-Lozano^{1,4}; Encarna García-Montoya^{1,4}; Josep M^a Suñe-Negre^{1,4}; Cristina Hernández-Munain³; Macarena Sánchez-Navarro³; Carlos Suñe³; **Marc Suñe-Pou^{1,4*}**

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

² Faculty of Pharmacy, University of Costa Rica, San José, Costa Rica.

³ Institute of Parasitology and Biomedicine Lopez-Neyra (IPBLN), CSIC, PT Salud, 18016, Granada, Spain

⁴ Pharmacotherapy, Pharmacogenetics and Pharmaceutical Technology Research Group Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain

*Correspondence: marcsune@ub.edu

Introduction

Neurodegenerative diseases represents a major public health concern, specially as population grows old. Their treatment is difficult because of the presence of the blood-brain-barrier (BBB).

Drug delivery strategies based on lipid nanoparticles (LNPs) emerges as promising candidates for specific therapies on the central nervous system, because of their protective and targeting capacity. The use of peptides decorated LNPs for BBB delivery has growing interest because of their versatility, high stability, low immunogenicity, and relatively simple production methods.

We aim to develop a shuttle system based on LNPs modified with peptides, specifically with rabies virus glycoprotein-peptide. We start from our prototype which was engineered using microfluidic mixing techniques and has previously demonstrated gene silencing capacity. Here, we explore the incorporation of the surface peptide: RVG, and focused on selecting the optimal type and quantity of maleimide lipid for the coupling reaction.

Results

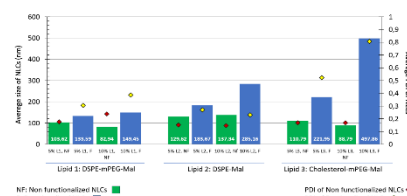
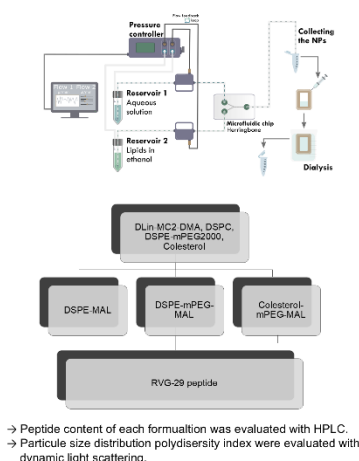


Figure 1. Particle size and PDI of RVG- functionalized LNPs and non-functionalized LNP.

Lipid Type	Functionalization efficiency (%)	
	at 5% MAL	at 10% MAL
Cholesterol-mPEG-Mal	18.99	14.30
DSPE-Mal	17.65	15.15
DSPE-mPEG-Mal	19.58	19.76

Table 1. Functionalization efficiency of RVG-peptide on LNPs from the theoretical content of maleimide.

Materials and Methods



- RVG-peptide was successfully incorporated to the LNP.
- Lower peptide content was probably due to maleimide availability.
- Functionalization conditions were specifically chosen to inhibit disulphide bridge formation and to promote thiol bond reactions, not necessarily to maximize maleimide stability.
- Significant differences related to the type of lipid used.
- Changes in lipid type are likely to affect the maleimide availability rather than their inherent reactivity.
- Further research is necessary to understand the impact of material selection and formulation variables on maleimide availability on the surface of LNPs

Conclusions

We successfully achieved the integration of peptides into biocompatible and stable nanoparticles. The use of DSPE-mPEG-Mal proved effective, demonstrating the highest maleimide availability and consistency across the tested quantities. This achievement highlights the potential of these carriers in delivering RNA through the BBB. Future advances should focus on increasing peptide content and evaluate BBB permeability. Areas for further research include lyophilization and the understanding of how maleimide availability is influenced by formulation variables

Presentación oral

XIX Congreso Nacional Farmacéutico

Active Targeting: ¿Es el eslabón clave en la evolución de las Nanopartículas?

San José, Costa Rica, 29/11/2023



COMISIÓN DE EDUCACIÓN FARMACÉUTICA CONTINUA

Confiere el presente certificado a:

Ronny Vargas Monge

Por su participación en el marco del XIX Congreso Nacional Farmacéutico como ponente en la charla:

Active Targeting: ¿Es el eslabón clave en la evolución de las Nanopartículas?

El 29 de noviembre del 2023
Tiempo efectivo 45 minutos
Firmado digitalmente por: YAJAIRA
QUESADA ROJAS (FIRMA)
Fecha y hora: 14.12.2023
16:39:35

Dra. Yajaira Quesada Rojas
Coordinadora
Unidad de Estandarización del Ejercicio Profesional

Tomo 3/Folio 31/Asiento 19

Los viajeros, encarcelados en un nuevo satélite,
si bien es verdad que no habían alcanzado su objetivo,
formaban al menos parte del mundo lunar; gravitaban alrededor del astro de la noche,
y por primera vez podía la vista penetrar todos sus misterios.

Julio Verne

