



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Bektore ez-biral lipidikoak
garatzeko erabiltzen diren
teknikak eta hauen garrantzia
etorkizunerako**

*Iván Maldonado Pérez,
Jon Zarate Sesma,
Gustavo Puras Ochoa,
Lucia Enriquez Rodriguez,
Idoia Gallego Garrido,
Mohamed Mashal, Noha Attia
eta José Luis Pedraz Muñoz*

153-158 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.04.19>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Bektore ez-biral lipidikoak garatzeko erabiltzen diren teknikak eta hauen garrantzia etorkizunerako

Ivan Maldonado Pérez^{1,2,3}; Jon Zarate Sesma^{1,2,3}; Gustavo Puras Ochoa^{1,2,3};
Lucia Enriquez-Rodriguez^{1,3}; Idoia Gallego Garrido^{1,2,3}; Mohamed Mashal¹;
Noha Attia¹; José Luis Pedraz Muñoz^{1,2,3}.

1. NanoBioCel taldea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) Vitoria-Gasteiz, Espainia.
2. Bioingeniaritza, Biomaterial eta Nanomedikuntzako Ikerketa Zentroa (CIBER-BBN), Vitoria-Gasteiz, Espainia.
3. Bioaraba, NanoBioCel Resarch Group, Vitoria-Gasteiz, Espainia

joseluis.pedraz@ehu.eus

Laburpena

Azken urteotan, bektore ez-biral lipidikoak oso aintzatetsiak izan dira COVID gaixotasunerako garatu diren txerto berriei esker. Hori dela eta, artikulu honetan, gure ikerketa-taldean lantzen ditugun bi bektore ez-biral motak azaltzen ditugu: niosomak eta partikula lipidikoak. Horien ekoizpenerako mikrofluidika eta sonikazio metodoak erabiltzen ditugu, eta aipatutako formulazioen aktibitatean metodo bakoitzak duen eragina erakusten dugu. Azkenik, formulazio berri horien oraingo eta etorkizuneko aplikazioak aipatzen ditugu, medikuntzaren arloan ekarri ditzaketan aurrerapenak azpimarratuz.

Hitz gakoak: Bektore ez-biral lipidikoak, Material genetiko, Sonikazio, Mikrofluidika

Abstract

In recent years, non-viral lipid vectors have gained important recognition thanks to the new vaccines that have been developed for COVID. For this reason, in this article we wanted to refer to the two types of vectors that we work with in our research group, niosomes and lipid particles. Focusing on their production processes, we will show the importance of microfluidic and sonicator methods in the activity of these formulations. Finally, we will mention the present and future applications of these new formulations, highlighting their potential to become one of the major advances in medicine.

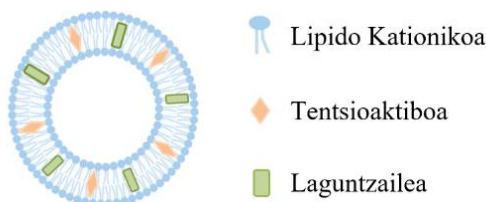
Keywords: Non-viral lipid vectors, Genetic material, Sonication, Microfluidics

1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egun, COVID-19aren ondorioz, RNA mezulariaren txertoak ezagunak egin dira (Pfizer[®] edo Moderna[®]) (Sainz-Ramos, M. et al., 2021). Txerto horien osagaietan bektore ez-biral lipidikoak daude. Bektore ez-biral lipidikoek osagai kationikoak daramatzate azido nukleikoa garraiatzeko, eta generikoki liposomak deitzen zaie. Bektore mota seguruenak dira; azido nukleikoa garraiatzeko bektore biralek baino ahalmen handiagoa dute, eta eskala handian fabrikatzeko errazagoak dira. Horiek garatzerakoan transfekzio ahalmen handiena ematen dieten lipidoak aukeratzen dira. Gure laborategian niosomak eta partikula lipidikoak garatzen ditugu:

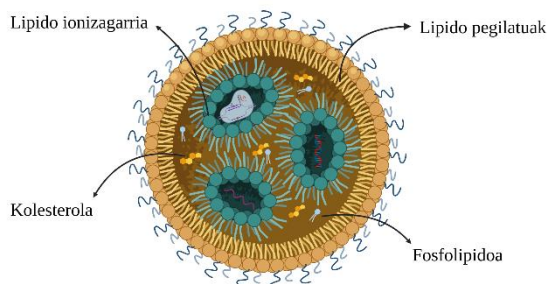
- Niosomek kanpotik karga positiboa duen geruza lipidiko bikoitza dute. Horrela, negatiboki kargatutako azido nukleikoarekin (material genetiko) batzen dira elkarrekintza elektrostikoari esker. Niosomek honako osagai hauek dituzte (A. Grijalvo et al. 2019)(1. irudia):
 - Lipido kationikoa: besikularen geruza lipidiko bikoitzeko osagai nagusia da; karga positiboa ematen dio, eta azido nukleikoarekin lotzeko ezinbestekoa da.
 - Tentsioaktiboa: besikulari egonkortasuna ematen dio eta niosomaren toxikotasuna murrizten du. Tentsioaktibo hauek ez dute karga ionikorik, horregatik murrizten dute toxikotasuna.
 - Laguntzailea: lipido kationikoarekin eta tentsioaktiboarekin elkartuz emultsifikatzen du. Niosomaren transfekzio ahalmenean, morfologian eta mintzaren iragazkortasunean eragiten du osagai honek.

1. Irudia: Niosomen egitura nagusia



- Nanopartikula lipidikoak (LNP): hainbat motatako lipidoz osatutako besikulak dira. LNPe material genetiko barnean paketatuta garraiatzen dute, eta honako osagai hauek osatuta daude (Jung, H. et al., 2022) (Irudia 2):
 - Lipido ionizagarria: formulazioaren osagai nagusia da, eta material genetiko paketatzen du.
 - Fosfolipidoak: nanopartikularen egituraren euskarriak dira, eta zelula barneko endosomatik ihesa errazten dute.
 - Kolesterola: fosfolipidoen antzera, kolesterolak endosomatik ihes egiten lagunduko dio LNPr.
 - Lipido pegilatuak: LNPa geruza hidrofilikoa osatzen du, eta molekulak oso handiak direnez, nanopartikularen tamaina handitzen dute immunitate sistematik ihes egiteko gaitasuna emanez.

2. Irudia: Nanopartikula lipikoen (LNP) egitura nagusia material genetiko mota ezberdinak eta CRISPR-Cas9 garraiatzen.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Sendagai berriak diseinatzeko, hiru printzipio hartu behar dira kontuan: kalitatea, segurtasuna eta eraginkortasuna. Artikulu honetan bektore ez-biral lipidikoak egiteko teknikan jarriko dugu arreta, zehazki, sonikazioan eta mikrofluidikan:

- Sonikazioa: teknika honen bidez niosomak prestatzen ditugu.
- Mikrofluidika: LNPa egiteko erabiltzen diren mikrofluidika metodoak aipatuko ditugu eta laborategian erabiltzen dugun metodoa aztertuko dugu.

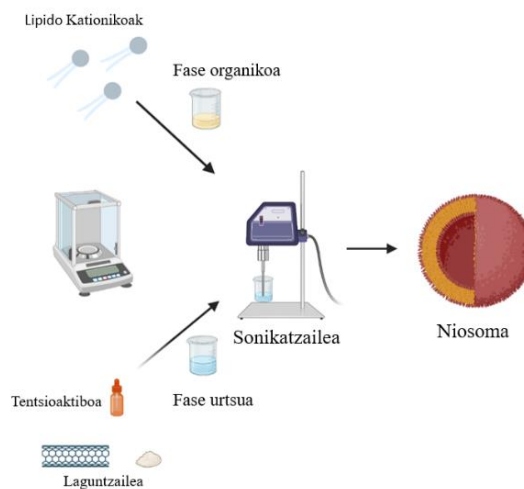
Teknikak azaldu ondoren alderatu egingo ditugu, eta, horretarako, teknika bakoitzarekin lortutako formulazio bakoitzaren abantailak eta desabantailak adieraziko ditugu. Gainera, formulazioak karakterizatzeko entseguak deskribatuko ditugu, eta, azkenik, niosomen eta LNPen aplikazioak aipatuko ditugu.

3. Ikerketaren muina

3.1. Niosomak garatzeko teknika: sonikazioa

Teknika honetan fase organiko bat eta fase urtsu bat nahastu eta ultrasoinuen bitartez sonikatu egiten dira (3. Irudia). Honako hau litzateke prozedura: lehenik eta behin, lipido kationikoa gehitzen da aurrez diklorometanoarekin garbitutako prezipitatu-ontzi batean; ondoren, osagai laguntzailea gehitzen da aurreko prezipitatu-ontzi berean, eta jarraian diklorometanoa gehitzen zaio gasentzako kanpaian. Horrela fase organikoa eraten da. Fase urtsua eratzeko aldiz, tentsioaktiboa uretan disolbatzen da kontzentrazio txikian (%1etik behera). Jarraian, bi faseak sonikatzailearekin 30 segundoz 50 W-era sonikatzen dira. Azkenik, diklorometanoa lurruntzen uzten da .

3. Irudia: Sonikazio metodoa

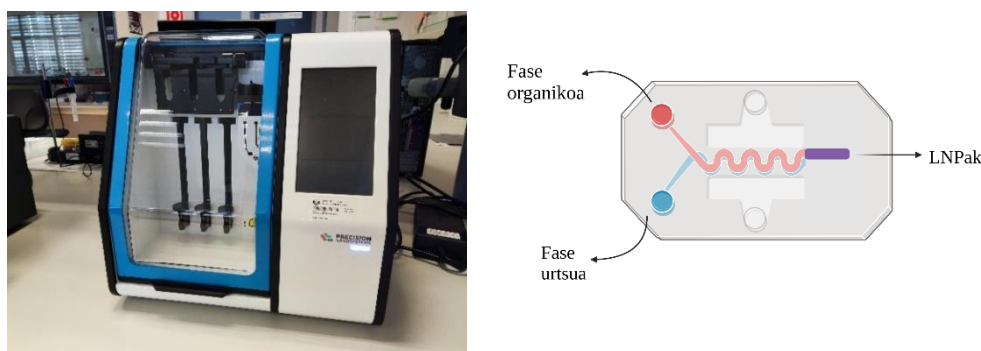


3.2 Mikrofluidika

Mikrofluidikaren bidez LNPa egiten dira. Horretarako fase organiko bat (lipido kationikoa eta LNP osatzen duten gainerako osagai lipidikoak dituena) material genetikoa duen fase urtsu batekin nahasten da. Faseen nahasketak egiteko hainbat metodo erabili daitezke. Fase organikoa fase urtsuarekin kontaktuan jartzeko erabiltzen den fluxuaren arabera, LNPen tamaina eta polidispersioa ezberdina izango da. Jarrain mikrofluidikan oinarritutako metodo ezberdinak (Maeki, M. et al., 2022):

- LNPak egiteko erabili ziren lehen makinek T edo Y konformazio sinpleak dituzte azken aldian garatutako nahasgailu kaotikoekin (4. Irudia) eta iLiNP tresnekin konparatuz. Horien desabantaila honako hau da: etanolaren eta fase urtsuaren arteko hedapena oso motela dela, eta, beraz, LNP handiak sortzen direla.
- Nahasgailu kaotikoak: metodo hauetan fluxuaren kontrola konformazio sinpleko makinetan baino handiagoa da. Gainera, nahasketa azkarra ahalbidetzen du, nahiz eta emaria handia izan. Gure laborategian erabiltzen dugun tresna NanoAssemblr[®] Ignite[™] da (4. Irudia), eta LNPak sortzeko zatiketa eta birkonbinazioko mikronahasgailu plano asimetrikoa (*planar asymmetric split-and-recombine micromixers*) dauka. Metodo honi esker fase organikoaren eta fase urtsuaren arteko nahasketa hobea da, eta sortzen diren LNPak homogeneoak eta bikoizgarriak dira.

4. Irudia: NanoAssemblr[®] Ignite[™] tresna eta bere mekanismoaren eskema



- iLiNP tresnak: erabiltzen duten metodoa T do Y konformazioa daukaten makinaren antzekoa da, baina kasu honetan emaria handiagoa denez, bi faseen hedapena azkarrago gertatzen da. Era berean, emaria kontrolatuz ezaugarri ezberdinetako LNPak lortu daitezke.

3.3 Bektore ez-biralen karakterizazio fisiko-kimikoa

Ekoiztako nanopartikulen kalitate kontrolerako karakterizazio fisiko-kimikoa oso garrantzitsua da. Bektore ez-biral lipidikoen tamaina, polidispersioa eta gainazaleko karga (zeta potentziala) neurtzeko ondorengo metodoak erabiltzen ditugu:

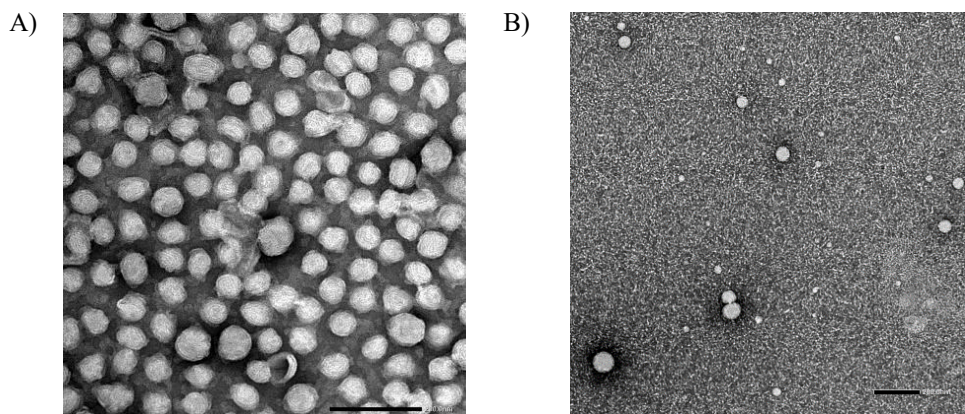
- Argi dispersio dinamikoa (DLS) (Ojeda et al.,2016): metodo honen bidez partikula tamaina zehazten da laser batekin Browndar higidura neurtuz. Atomoek edo molekulek ausazko mugimenduen bidez duten energia termikoa energia zinetikoan bihurtzen dute eta Browndar higidura sortzen da. Higidura hau partikula esekien tamainarekiko alderantziz proportzionala da, eta, beraz, zenbat eta handiagoa izan Browndar higiduraren balioa, orduan eta txikiagoa izango da partikulen tamaina. (1. Taula)
- Zeta potentziala (ζ): parametro honek nanopartikulen gainazaleko karga elektrikoa adierazten du. Karga hori negatiboa, neutroa edo positiboa izan daiteke. (1. Taula).

1. Taula: Laborategian ekoiztako Niosomen eta LNP tamainaren, polidispersioaren eta zeta potentzialaren balioak bere desbiderapen estandarekin (STD)

	Tamaina (nm)		PDI		Zeta (ζ) (mV)	
	Batez besteko	STD	Batez besteko	STD	Batez besteko	STD
Niosoma	113,06	1,68	0,207	0,01	52,53	2,19
LNP	72,05	2,88	0,200	0,03	-4,87	0,82

- Transmisioko mikroskopia elektronikoa (TEM): laginak bistaratzeko elektroioak erabiltzen dituen mikroskopia optikoak ez bezala, TEMak fotoiak erabiltzen ditu, eta 0,2 nm arteko egiturak bistaratzera ahalbidetzen du (5. Irudia).

5. Irudia: LNP (A) eta niosomak (B) TEM mikroskopia erabiliz ateratako argazkiak



Gure helburua 50-150 nm bitarteko nanopartikula homogeneousak (polidispersio baxua) sortzea da. Niosomen kasuan karga positiboa izatea bilatzen dugu karga negatiboa duen azido nukleikoarekin elkartzeko; LNPe tan aldiz, azido nukleikoa nanopartikularen barruan doanez, karga neutroa izatea interesatzen zaigu. 1. Taulako hiru parametro horiek ondo karakterizatzea garrantzitsua da azido nukleikoaren transfekzioan eragin dezaketelako. Era berean, mikroskopia elektronikoaren bitartez nanopartikulen forma eta egitura ondo ezagutu behar da. Hori guztia kontutan izanik, jakin baikenezake transfektatu beharreko zelula mota bakoitzarentzako nanopartikula egokienak zeintzuk diren eta horiek ekoizteko teknika egokiena zein den. Mikrofluidika oso teknika berria denez transfekzioa helburu duten ikerketetan, ikerketa lan gutxi aurkitu ditzakegu. Bestalde, sonikazioarekin eratutako nanopartikulekin esperientzia handiago dago transfekzioa helburu duten ikerketetan (Sainz-Ramos, M. et al., 2021).

4. Ondorioak

Sonikazio eta mikrofluidika bidezko teknikak sektore ez-biral ezberdinak sortzeko erabiltzen direla ikusi dugu. Horrez gain, teknika horiek beste zenbait abantaila eta desabantaila dauzkate. Mikrofluidika teknika erreproduzigarria da, prozesua automatizatuta dagoelako. Sonikazioan aldiz, prozesua manuala denez, erreproduzigarritasun txikiagoa dauka.

Bestalde, sonikazio bidezko teknika egoerara moldagarriagoa da. Izan ere, sonikatzaile bat bakarrik behar da, eta testuinguru klinikoan adibidez, edozein ospitaletan sektore ez-biralak sonikazioz ekoizti ahalko lirarteke. Mikrofluidikak aldiz, eskakizun gehiago ditu: tresna espezifikoak behar dira, laborategi farmazeutikoak berea propioa daukate eta egin beharreko inbertsioa handiagoa da. Beraz, ospitale batean horrelako tresna bat jartzeko muga gehiago dago.

Azkenik, artikulu honetan azaldu dugun bezala, hainbat dira transfekziorako nanopartikulak ekoizteko prozesuan eragiten duten aldagaiak (formulazioaren osagaiak, nanopartikulen ezaugarri fisiko-kimikoak, transfektatu nahi diren zelulak, ...). Ondorioz, nanopartikula ekoizteko teknikaren aukeraketa ere aipatu baldintza horiek kontutan izanda egin behar da. Argi dagoena da, teknika horiek medikamentu berritzaileak garatzeko ahalmen handiagoa ematen digutela. Gakoa teknika bakoitzaren abantailak helburutzat dugun aplikaziorako aprobetxatzea da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Bektore ez-biral lipidikoak egiteko teknika ezberdinen garapenari esker aukera gehiago izango dugu sendagai berritzaileak garatzeko. Besteak beste, mRNA oinarri duten txertoak (COVID-19aren aurkako txertoaren parekoak) garatu ahalko dira, edota oinarri genetikoak duten fibrosi kistikoa bezalako gaixotasun arraroen terapia genikoko medikamentuak. Duela urte batzuk ezinezkoa zirudiena, gaur egun posible da sonikazioa eta mikrofluidika bezalako tekniken garapenari esker, eta seguru gaude, etorkizunean ere, teknika berriak asmatuko direla terapia aurreratuko medikamentuen garapenaren mesedetan.

6. Erreferentziak

- Sainz-Ramos, M., Gallego, I., Villate-Beitia, I., Zarate, J., Maldonado, I., Puras, G., & Pedraz, J. L. (2021). How Far Are Non-Viral Vectors to Come of Age and Reach Clinical Translation in Gene Therapy? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7545. 10.3390/ijms22147545
- A Grijalvo, S., Puras, G., Zárata, J., Sainz-Ramos, M., Qtaish, N. A. L., López, T., Mashal, M., Attia, N., Díaz, D., Pons, R., Fernández, E., Pedraz, J. L., & Eritja, R. (2019). Cationic Niosomes as Non-Viral Vehicles for Nucleic Acids: Challenges and Opportunities in Gene Delivery. *MDPI AG*. 10.3390/pharmaceutics11020050
- Jung, H. N., Lee, S., Lee, S., Youn, H., & Im, H. (2022). Lipid nanoparticles for delivery of RNA therapeutics: Current status and the role of in vivo imaging. *Ivyspring International Publisher*. 10.7150/thno.77259
- Maeki, M., Uno, S., Niwa, A., Okada, Y., & Tokeshi, M. (2022). Microfluidic technologies and devices for lipid nanoparticle-based RNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 344, 80-96. 10.1016/j.jconrel.2022.02.017
- Ojeda E, Agirre M, Villate-Beitia I, et al. Elaboration and Physicochemical Characterization of Niosome-Based Nioplexes for Gene Delivery Purposes. *Methods Mol Biol*. 2016;1445:63-75

7. Eskerrak eta oharrak

Proiektu hau Espainiako Zientzia eta Berrikuntza Ministerioak babestu zuen (PID2019-106199RB-C21 beka). Egileek eskerrak eman nahi dituzte “NANBIOSIS” ICTSren laguntza intelektual eta teknikoagatik; zehazki, Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Bioingeniaritza, Biomaterial eta Nanomedikuntzako CIBERen Medikamentuen Formulazio Unitatearena (U10).