



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

APLICACIONES TERAPÉUTICAS DEL ÁCIDO POLI LÁCTICO-CO- GLICÓLICO (PLGA)

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Diciembre 2020

Autor: Noelia Valero García

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor/es: Marta González Álvarez e Isabel González Álvarez

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Introducción	3
2.1. Generalidades PLGA	4
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas	5
2.1.2 Perfil farmacocinético y de biodistribución.....	6
2.1.3 Toxicidad	6
2.2. Usos generales del PLGA	7
2.3. Métodos de síntesis tradicionales	9
2.3.1 Método de evaporación de solvente-emulsión simple y doble.....	9
2.3.3 Secado por aspersion	9
2.3.4 Emulsificación/salado.....	10
2.4 . Métodos de síntesis innovadores.	10
2.4.1 Plataformas de micro fluidos.....	10
2.4.2 Emulsificación por extrusión de membrana.....	11
2.4.3 Técnica PRINT	11
2.5. Funcionalización de las partículas de PLGA	12
3. Objetivos del estudio	13
4. Materiales y métodos	14
5. Resultados y discusión	15
5.1 Características terapéuticas.	15
5.2 Formas farmacéuticas.	16
5.3 Uso del PLGA en formulación de vacunas.	24
5.4. Ventajas del uso del PLGA en el tratamiento del cáncer.	31
5.5 Otras patologías que utilizan el PLGA	36
6. Conclusión	38

1. Resumen

El poliácido láctico-co-glicólico (PLGA) es uno de los polímeros sintéticos que denota un gran interés como material para aplicaciones biomédicas, siendo uno de los más utilizados para el progreso de sistemas de administración de fármacos y biomoléculas terapéuticas y, como componente de la ingeniería de tejidos. Debido a su biocompatibilidad, propiedades fisicoquímicas, tasa de biodegradación y, baja toxicidad la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) acepta su uso clínico en humanos. Además, su superficie puede modificarse, variando sus propiedades y pudiendo ofrecer una mejor interacción con materiales biológicos. Este trabajo fin de grado revisa las aplicaciones terapéuticas del PLGA, con mayor énfasis en su uso en inmunoterapia y terapia antitumoral.

2. Introducción

El desarrollo de polímeros sintéticos es considerado uno de los grandes avances del último siglo. Por ejemplo, los plásticos que utilizamos en nuestro día a día están compuestos por polímeros, su estructura macromolecular puede ser moldeada mediante calor o presión y, se obtienen mediante la polimerización de monómeros [1]. El inconveniente más notable de estos polímeros es su escasa capacidad de degradación en el medio ambiente, debido a esta consecuencia, que conlleva la contaminación del medio en el cual habitamos, se desarrollan los polímeros biodegradables.

Los polímeros biodegradables se producen a partir de productos químicos basados en fuentes de energía renovables. Éstos se pueden clasificar, según la fuente de la que provengan, en tres subgrupos: basados en recursos renovables (celulosa y almidón), basados en monómeros bioderivados (ácido láctico y aceites vegetales) y, biopolímeros sintetizados por microorganismos (polihidroxialcanoatos (PHA)). Los tres subgrupos de polímeros biodegradables son ampliamente utilizados en industria, con ellos se pueden fabricar diversos tipos de plásticos que no resultan contaminantes para el medio ambiente, además, los derivados del ácido láctico y los PHA se utilizan en aplicaciones biomédicas como pueden ser hilos de sutura, placas de

hueso, injertos en vasos sanguíneos, estructuras quirúrgicas, etc. Dado que tienen una amplia biodegradabilidad y biocompatibilidad [2][3].

Tanto los derivados del ácido láctico, como los PHA se degradan a sustancias que son utilizadas en los ciclos internos del organismo (CO_2 , glucosa, H_2O ...), por lo que su uso en componentes biomédicos tiene resultados óptimos por su inocuidad. Las aplicaciones biomédicas que pueden llevarse a cabo con estos biopolímeros, resultan ser un gran avance en las técnicas médicas y prótesis quirúrgicas que se usan día a día en diferentes intervenciones. No sólo resultan innovadores en medicina, sino también en el uso de fármacos, ya que, con estos polímeros pueden realizarse cubiertas modificables, las cuales engloban un fármaco o varios, produciendo así vehículos para el fármaco que pueden ser dirigidos a tejidos localizados, consiguiendo así, posibles tratamientos para patologías específicas. En este caso, el estudio se centra en las posibles aplicaciones biomédicas de los derivados del ácido láctico, más concretamente del poliácido láctico-co-glicólico (PLGA).

2.1. Generalidades PLGA

El PLGA es un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (PGA), se sintetiza por la copolimerización con apertura de anillo de dos monómeros diferentes, los dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-dionas) de ambos ácidos. Se pueden formar como copolímeros en bloque o aleatorios, proporcionando propiedades poliméricas adicionales. Los catalizadores 2-etilhexanoato de estaño (II), alcóxidos de estaño (II) o isopropóxido de aluminio son los usados normalmente en la preparación de este polímero. Durante la polimerización, sucesivas unidades de los ácidos se unen juntas en PLGA mediante enlaces éster, produciendo un poliéster alifático lineal como producto. El ácido láctico contiene un α -carbono asimétrico, dando la forma D o L. El ácido poli-D-láctico (PDLA) y ácido poli-L-láctico (PLLA) son las formas enantioméricas del polímero poliácido láctico (PLA), en el PLGA se pueden hallar las dos formas en la misma proporción [4].

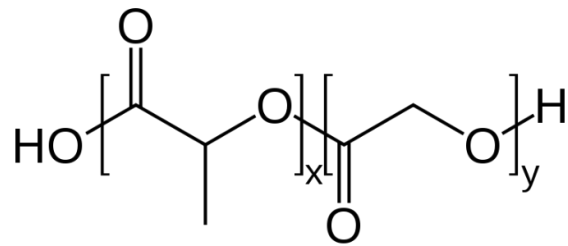


Figura 1: Estructura del PLGA.

2.1.1 Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas de las formas enantioméricas PDLA y PLLA, ópticamente son prácticamente las mismas. En general, el polímero PLA puede prepararse de dos formas diferentes, en su forma altamente cristalina (PLLA) o en su forma completamente amorfa (PDLA) debido a las cadenas del polímero desordenadas. El PGA carece de cualquier grupo lateral de naturaleza metilo y tiene una estructura altamente cristalina en contraste con el PLA como se puede ver en la figura 1 (imagen de la estructura del PLGA). El PLGA puede sintetizarse en casi cualquier tamaño y forma y, puede englobar moléculas de prácticamente cualquier tamaño. Es soluble en una gran variedad de disolventes, incluidos los disolventes clorados, el tetrahidrofurano, la acetona o el acetato de etilo. Es soluble en agua, ya que el PLGA se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster. Los grupos laterales de metilo en PLA lo hace más hidrófobo que el poliácido glicólico y, por ello, los copolímeros de PLGA que son ricos en PLA son más hidrófobos, absorben menor cantidad de agua y por eso se degradan más lentamente. Debido a su hidrólisis, los parámetros que se consideran descriptores invariables de una formulación sólida pueden cambiar con el tiempo, como el contenido de humedad, la temperatura de transición vítrea (Tg) y, el peso molecular. Estas propiedades afectan a la velocidad de liberación del fármaco en matrices poliméricas biodegradables, por lo que se ha estudiado ampliamente. La resistencia mecánica, la capacidad de sufrir hidrólisis, el comportamiento de hinchamiento y, posteriormente, la tasa de biodegradación que tenga el polímero está directamente relacionados con el grado de cristalinidad del PLGA, que depende, también, del tipo y la relación molar del PLA y PGA en la cadena del copolímero. El PGA cristalino, se copolimeriza con

PLA, reduciendo el grado de cristalinidad del PLGA y, así, aumenta la tasa de hidratación e hidrólisis. Como regla general, cuanto mayor es el contenido de PGA el polímero se degrada más rápido, exceptuando la proporción 50:50 de PLA/PGA, que demuestra la tasa de degradación más rápida [3] [6].

El grado de cristalinidad, la viscosidad intrínseca y el punto de fusión están íntimamente relacionados con el peso molecular del polímero. La Tg de los copolímeros de PLGA está por encima de la temperatura fisiológica de 37 ° C y, por lo tanto, su naturaleza es vítrea, exhibiendo una estructura de cadena bastante rígida. La Tg del PLGA disminuye cuando se realiza una disminución de la cantidad de PLA y con una disminución del peso molecular [4].

2.1.2 Perfil farmacocinético y de biodistribución

Para que el efecto terapéutico sea el indicado, el PLGA debe poder otorgar su carga útil con una biodistribución, duración y, concentración adecuadas. Por lo tanto, el material, la geometría y la ubicación son elementos esenciales del diseño, estos deben incorporar mecanismos de eliminación del vehículo y de degradación, así como ingredientes farmacéuticos activos (API).

La biodistribución y farmacocinética del PLGA sigue un perfil no lineal y dependiente de la dosis. Además, otros estudios sugieren que tanto la captación por el sistema de fagocitos mononucleares (MPS) como el aclaramiento sanguíneo pueden ser dependientes de la dosis y composición de los sistemas portadores de PLGA. Asimismo, los experimentos realizados de autorradiografía de cuerpo completo y distribución cuantitativa indican que algunas formulaciones de PLGA, como las nanopartículas (NP) , se pueden acumular de forma rápida en hígado, médula ósea, ganglios linfáticos, bazo y macrófagos peritoneales. Alrededor del 30% de los portadores de PLGA se degrada rápidamente en su etapa inicial y por último se ralentiza para eliminarse mediante la respiración en el pulmón [4] [5] [6].

2.1.3 Toxicidad

Los estudios toxicológicos sobre dispositivos sintetizados con PLGA sugieren que puede haber reacciones tisulares locales en el sitio de administración.

Aunque son generalmente leves y se ha manifestado que el PLGA es extremadamente seguro como materia para sistemas macroscópicos y de micropartículas, pueden surgir algunas consideraciones únicas cuando se utilizan a nano escala [4].

2.2. Usos generales del PLGA

El uso del PLGA en componentes biomédicos data en la década de 1970 , cuando se desarrolla como material para suturas biodegradables, después su utilización avanza con la producción de dispositivos como implantes, injertos de tejidos y prótesis. El PLGA destaca con gran atención por sus características favorables de biocompatibilidad y degradación. Ahora, la tecnología ha progresado notablemente, llegando a la nano escala. En ese ámbito, el PLGA ha sido empleado para formar cubiertas con las que encapsular fármacos como doxorrubicina, cisplatino, docetaxel, entre otros.

Las partículas de PLGA ofrecen grandes ventajas para las aplicaciones biomédicas: pueden dirigirse a un tejido en concreto utilizando anticuerpos, se rodea el ADN y otras biomoléculas protegiéndolas así de la degradación, modificado con ligandos dirigidos mejora eficazmente la respuesta inmune...

Dado que es un copolímero, según las proporciones que se elijan de ácido láctico y ácido glicólico, el biopolímero tendrá unas características u otras. Por ejemplo, para su aplicación en hilos de sutura, sus proporciones son de 10:90 con una construcción en forma de trenza [3].

El PLGA es un copolímero en el cual se repiten unidades de ácido láctico y ácido glicólico, los cuales el cuerpo puede metabolizar mediante el ciclo de Krebs hasta CO_2 y H_2O . Puede ser sintetizado por policondensación directa de ambos ácidos, dando lugar a copolímeros de bajo peso molecular y amplia distribución de masa molar. La degradación del PLGA en el organismo, depende del radio entre los dos ácidos, los polímeros que tienen una relación 50:50 tienen la mayor velocidad de degradación, 2 meses *in vivo*. Según los valores de esa relación, se pueden disolver en diferentes tipos de disolventes orgánicos, si la proporción es mayor en ácido láctico se disuelve mejor en disolventes clorados (cloroformo, diclorometano...) y en solventes miscibles con agua (acetona o tetrahidrofurano),

sin embargo, si hay más ácido glicólico, son preferibles los disolventes fluorados como el hexafluoroisopropanol. Además de las características que posee por sí solo, es posible añadirle otros componentes para aumentar su tiempo en el organismo, como puede ser el polietilenglicol (PEG) que hace que sea prácticamente indetectable debido a una capa que forma alrededor de las partículas de PLGA, evitando así su paso por el retículo endoplasmático liso (RES), alargando su vida media en el torrente sanguíneo, también aumenta su hidrofiliidad reduciendo las posibles interacciones con lípidos o proteínas séricas. Un inconveniente de añadir cadenas de PEG, es que las cabezas de PEG producen peróxidos tóxicos cuando se metabolizan o su acumulación de en vacuolas en el interior de los órganos. Otro de los componentes utilizados es el polisorbato 80 (TWEEN®-80), éste puede mejorar la señalización proapoptótica de las células, pudiendo usarse preferentemente como diana para células cancerosas, también es útil para mejorar el transporte de fármacos a través de la membrana hematoencefálica, sin embargo, puede causar reacciones anafilactoides no inmunológicas graves.

Tabla 1. Descripción general de los métodos de síntesis de partículas de PLGA

Método	Rango de diámetro	Método de mezcla	Solvente	Surfactante	Desventajas	Ventajas	Referencia
Evaporación de solvente de emulsión única	0,1-10 µm	Sonicación	DCM Cloroformo Acetato de etilo	Colato de sodio PVA Pluronic F88	Tamaño del esfuerzo cortante afectado por la carga	Adecuado para compuestos hidrofílicos, disolventes no tóxicos	[7] [4]
Evaporación de solvente de emulsión doble	~50-700 nm	Homogeneización por sonicación	DCM Cloroformo Acetato de etilo	PVA Tween-80 Pluronic F88	Tamaño afectado por el tamaño de la carga, afectado por la concentración de polímero	Adecuado para la evaporación de disolventes de compuestos lipofílicos	[4] [7]
Nanoprecipitación	80-700 nm	N/A	Acetonitrilo Acetona Etanol	PVA Poloxámero Poloxaminas Pluronic F88	Tamaño afectado por la concentración de polímero	Bajo consumo de energía sin grandes fuerzas de reparto	[8] [9] [10]
Secado por aspersión	<10 µm	N/A	Acetona Cloroformo Metanol Acetato de etilo	Tween-80 Pluronic F88 Pluronic F127 Poloxámero	Diversidad en la forma de las partículas. Adhesión de las partículas al secador por atomización	Proceso rápido de alta eficiencia de atrapamiento	[3] [4]
Emulsificación/salado	100-500 nm	Homogeneización	Acetona THF DMSO	PVA poli(vinil pirrolidona)	Baja eficiencia de encapsulación, bajo rendimiento, alta polidispersidad	Minimiza el estrés en la carga de proteínas, bueno para sustancias sensibles al calor	[3] [4]
Microfluidos	200-1000 nm, hasta varios µm	N/A	DMC DMSO DCM	PVA Tween-20/80	Mezcla difusiva lenta	Gotitas monodispersas	[11]
Emulsificación por extrusión de membrana	200 nm hasta 80 µm	Homogeneización por sonicación	DCM Acetato de etilo	PVA Tween 20/80 Poloxámero Pluronic F88	Flujo de fase dispersa máximo bajo	Tamaños de gota controlados, distribución de tamaño estrecho, menos energía utilizada	[12]
Replicación de partículas en plantilla no humectante (PRINT)	10nm-200µm	N/A	Etanol	Tween-20 PVA	preparación del dispositivo de varios pasos	Control sobre la forma, tamaño y encapsulación de la superficie de varias cargas, alta carga de fármaco	[3]

*DCM: diclorometano, THF: tetrahidrofurano, DMSO: dimetilsulfóxido, DMC: carbonato de dimetilo, PVA: alcohol polivinílico.

Hay diferentes métodos para sintetizar las micro y nanopartículas de PLGA (tabla 1), cada una con finalidades específicas adecuadas a la distribución por tamaños.

2.3. Métodos de síntesis tradicionales

2.3.1 Método de evaporación de solvente-emulsión simple y doble

Los métodos estándar de emulsificación están basados en dos tipos de emulsiones, emulsiones aceite/agua (o/w) en caso de la evaporación de solvente-emulsión simple o agua/aceite/agua (w/o/w) si se trata de la evaporación de solvente-emulsión doble, pudiendo encapsular diferentes fármacos lipofílicos o hidrofílicos. En esta técnica se tiene la fase oleosa con el PLGA y un agente lipofílico en un disolvente no polar, y la fase acuosa que tiene el surfactante. La fase orgánica se vierte sobre la fase acuosa mediante homogeneización o sonicación, después se evapora el disolvente y se recolectan las partículas, que se congelan posteriormente.

Con el método de emulsión simple se pueden encapsular componentes hidrofóbicos y, con la emulsión doble componentes hidrofílicos. (figura 2A/B)

2.3.2 Nanoprecipitación

Con este método se consiguen partículas de tamaño inferior a 100 nm, se utiliza típicamente para encapsular fármacos hidrofóbicos. Se da disolviendo el fármaco junto al polímero en un solvente polar miscible con agua, utilizando un auto inyector se va añadiendo de manera controlada sobre una fase acuosa. Los fármacos hidrofílicos tienen una baja interacción con el PLGA, por lo que conduce a la difusión del fármaco durante la difusión del disolvente de la fase orgánica. (figura 2D)

2.3.3 Secado por aspersion

Pueden encapsularse ambos tipos de fármacos, hidrofílicos e hidrofóbicos, péptidos y proteínas. Sobre una corriente de aire caliente se pulveriza una dispersión del sólido sobre aceite o una emulsión w/o consiguiendo así las

partículas. La selección entre un método u otro depende de las propiedades de los componentes empleados, particularmente si son hidrófobos o hidrófilos, un posible inconveniente de esta técnica es la acumulación de las partículas en el spray, el cual se resuelve si se aplica un antiadherente a las paredes del spray. (figura 2C/H)

2.3.4 Emulsificación/salado

Este método se basa en la separación de una fase acuosa de una orgánica mediante la adición de los componentes electrostáticos adecuados. Es una técnica favorable para la encapsulación de fármacos hidrofóbicos, donde el tamaño no se ve alterado en gran medida por la concentración de polímero. Es un método útil para procesar sustancias termolábiles y que puede amplificarse fácilmente. Sin embargo, los inconvenientes del salado incluyen una baja eficiencia de atrapamiento y un alto índice de polidispersidad. (Figura 2G)

2.4. Métodos de síntesis innovadores.

2.4.1 Plataformas de micro fluidos

Las plataformas pueden construirse con diversos materiales como pueden ser el cristal, la silicona o polímeros (polidimetilsiloxano (PDMS)), consiguiendo diferentes geometrías para controlar la formación de las gotas. La geometría más simple es la de forma de T, pero a su vez es la más utilizada, juntando dos canales perpendicularmente entre ellos se consigue esta forma. En el sistema de enfoque de flujo, la formación de las gotas es similar a la de forma de T y, por último, el sistema de “arroyos que fluyen conjuntamente” que se usa junto al sistema anterior para crear emulsiones dobles. El tamaño y la forma de las gotas depende del sistema utilizado, la mayor ventaja de este método es poder elegir la composición química y estructura de las partículas necesarias para una aplicación específica. (Figura 2E/I)

2.4.2 Emulsificación por extrusión de membrana

Forma emulsificaciones que tienen un margen de tamaño estrecho y se puede obtener gotitas de 200 nm a 1-5 μm , normalmente se usan películas compuestas de policarbonato o politetrafluoroetileno. Esta tecnología implica la síntesis de emulsiones simples y dobles. A través de este método podemos obtener partículas más uniformes, lo que es una gran ventaja. Además, a diferencia de los métodos tradicionales de encapsulación la emulsificación por extrusión de membrana puede encapsular simultáneamente los fármacos hidrófilos o lipófilos y los agentes de formación de imágenes (como los puntos cuánticos) conduciendo a la formación de partículas multifuncionales. (Figura 2F)

2.4.3 Técnica PRINT

El método PRINT (reproducción de partículas en una plantillas no humedecidas) utiliza moldes hechos de fluoro polímeros para producir partículas con un tamaño entre 10 nm y 200 μm . Esta técnica puede sintetizar partículas con tamaños y formas específicas, de manera similar, permite que las partículas se carguen con fluoruro, un agente de contraste para la resonancia magnética (MRI) y fármacos quimioterapéuticos hidrofílicos o hidrofóbicos. (Figura 2J)

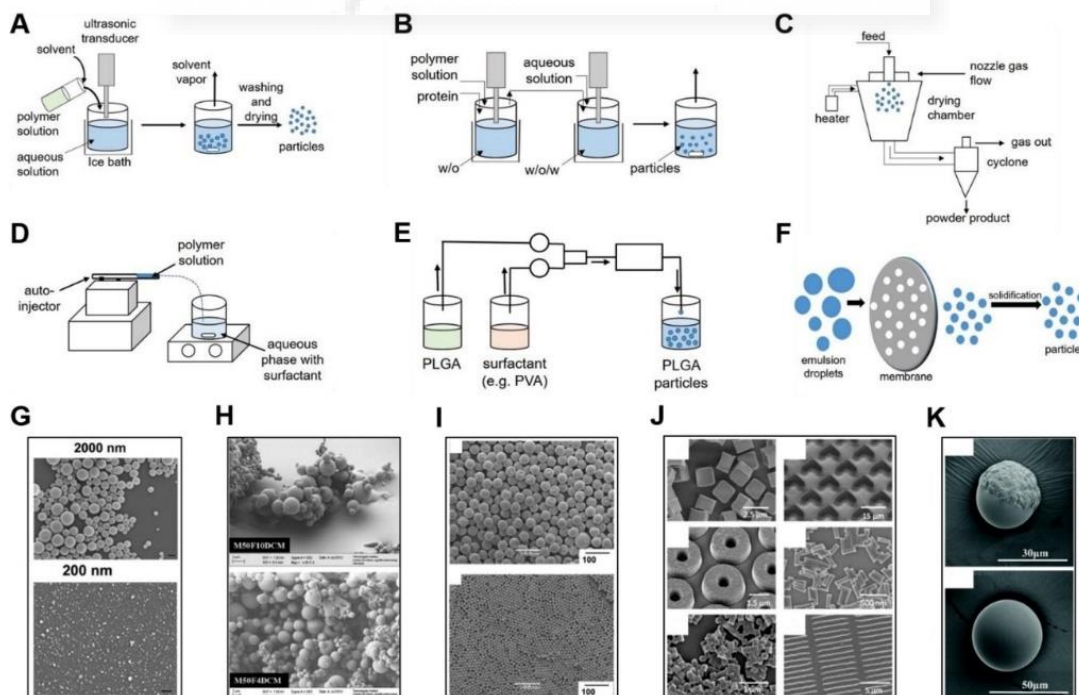


Figura 2. Representación gráfica de diferentes técnicas de preparación de partículas de PLGA. (A) evaporación de solvente de emulsión simple y (B) doble (C) secado por aspersión (D) nanoprecipitación (E) plataformas de micro fluidos y (F) emulsificación por extrusión de membrana.(G) emulsificación/salado (H) secado por aspersión (I) plataformas de micro fluidos (J) Técnica PRINT: partículas de diferentes formas (K) Partículas de Janus

2.5. Funcionalización de las partículas de PLGA

Por modificaciones químicas al PLGA se ha obtenido “partículas inteligentes”, es decir, añadiendo sustituyentes, conectando nuevas moléculas o grupos funcionales, se dota a estas partículas de cualidades especiales como responder al valor del pH específico del medio, temperatura e incluso luz, cambiando así sus propiedades originales.

A través del enlace éster en los aminos β [13], del autoensamblaje entre capas de poli (ácido acrílico) como componente sensible al pH y poli (cloruro de dialilmetilamonio) (PDADMAC) como poli catión liberable [14] (figura 3) se obtienen partículas de PLGA que responden a un pH determinado. La ventaja de esta modificación es que permite que el fármaco se libere en diferentes ambientes ácidos o alcalinos, como en los tumores sólidos, ya que aprovecha el ambiente ácido del tumor.

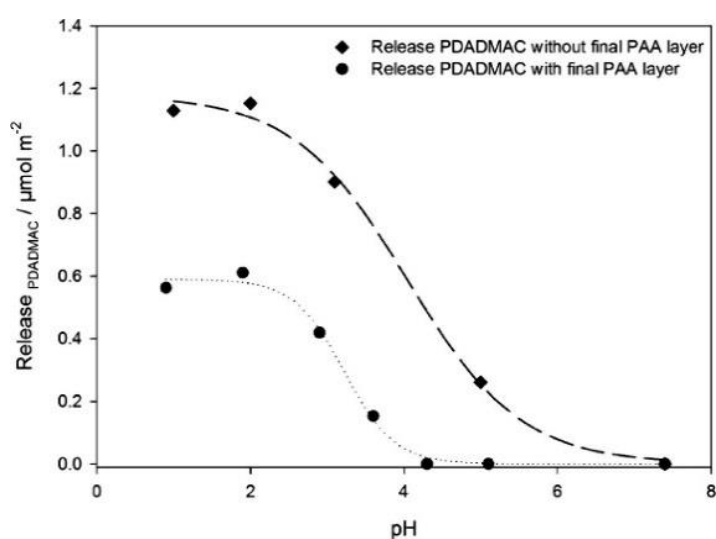


Figura 3. Cantidad liberada de PDADMAC por área de superficie en dependencia del pH [14]. Copyright (2015) Beilstein Journal of Nanotechnology.

Las partículas sensibles a la temperatura están compuestas de materiales que son solubles en medios acuosos solo cuando se alcanza la temperatura crítica determinada, ya sea por encima (UCST) o por debajo de la temperatura crítica (LCST). La poli (*N*-isopropilacrilamida) (pNIPAm) es probablemente el polímero termosensible más estudiado. A una temperatura más baja que la LCST, las nanopartículas de pNIPAm se hinchan y se vuelven hidrófilas y, cuando la temperatura es más alta que la LCST, el polímero se vuelve hidrófobo y las nanopartículas colapsan [3]. Ejemplos de su aplicación, en el tratamiento de células cancerosas en melanoma y la encapsulación de naltrexona para el antagonismo de los opioides [3].

Los ejemplos típicos de partículas de PLGA fotosensibles son aquellas que contienen un nucleófilo protegido por un grupo o-nitrobencilo fotoescindible (ONB) que puede degradarse en respuesta a la luz ultravioleta (UV). La irradiación de luz hace que el polímero sea más hidrófilo, permitiendo que el agua entre en las partículas, promoviendo así la hidrólisis de la estructura del polímero. Este método puede combinar partículas que son sensibles a la luz y la temperatura porque el PLGA se metaboliza a mayor velocidad con temperaturas altas. En cualquier caso, debe tenerse en cuenta la baja penetración de la luz externa a los tejidos biológicos a la hora de diseñar este tipo de partículas. Hay otro tipo de partículas fotosensibles, que son partículas de conversión ascendente. Estas partículas tienen la capacidad de convertir la luz infrarroja cercana (NIR) en luz ultravioleta, luz visible o longitudes de onda más bajas en la región del infrarrojo cercano mediante láseres de diodo de onda continua de baja potencia, lo que permite que la luz penetre en los tejidos profundos para activar las partículas [4].

3. Objetivos del estudio

El objetivo de este trabajo es profundizar en las aplicaciones terapéuticas del PLGA. En concreto los objetivos específicos son:

- Determinar las características que hacen del PLGA un polímero con posibilidades terapéuticas.
- Identificar las formas farmacéuticas que se obtienen a partir del PLGA para las aplicaciones.
- Determinar las posibilidades del PLGA en la formulación de vacunas.
- Explorar las ventajas que supone el uso del PLGA en el tratamiento del cáncer.
- Indicar qué otras patologías se pueden beneficiar al incluir formulaciones con PLGA en su tratamiento.

4. Materiales y métodos

Para la realización de este trabajo fin de grado, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de diferentes artículos científicos obtenidos de diferentes fuentes como *Scopus*, *Web of Science* y su conexión con editoriales como *Elsevier*, *Pubmed* y otra serie de plataformas. Para la búsqueda se han utilizado palabras claves como “PLGA”, añadiendo especificaciones en sus aplicaciones, uso terapéutico... especificando este término como *Major Topic* para darle una mayor importancia. Una vez cubierta esta parte, se profundiza en una búsqueda más detallada sobre las aplicaciones del PLGA que interesan en mayor medida, como es su aplicación en el cáncer y en las vacunas para lo que se utilizan palabras claves como “quimioterapia”, “neoplasias”, “inmunidad” o “autoinmune”.

Los criterios de inclusión utilizados para admitir el texto son que esté publicado en los últimos 5 años, el acceso al texto completo sea posible, que contenga las palabras claves, el idioma de publicación sea inglés y, que el texto tenga interés al tema en cuestión y no se solape la información, sino se cumple alguno de estos criterios el texto queda excluido.

El número total de artículos conseguidos es 1752, acotando el rango de búsqueda con las palabras claves y filtros elegidos, el número final de artículos utilizados es 80.

5. Resultados y discusión

5.1 Características terapéuticas.

Las características que dotan al PLGA de poder usarse en terapias son:

- El método por el cual se obtiene el PLGA es un método reproducible.
- Los compuestos que se obtienen cuando se metaboliza (ácido láctico y ácido glicólico) son sustancias que en el organismo pueden degradarse mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos dando como resultado CO_2 y H_2O . Estos compuestos no producen toxicidad, lo que dota al PLGA de una escasa toxicidad para el organismo.
- Sus productos de desechos se eliminan mediante la respiración, las heces y la orina, por lo que no existe acumulación en el organismo a dosis bajas.
- Su biocompatibilidad se comprobó tanto in vivo como in vitro, esta está influenciada por los polímeros y, por la naturaleza de los productos de degradación y la tasa de degradación.
- Se metaboliza mediante hidrólisis de los enlaces tipo éster que une los monómeros de ácido láctico y ácido glicólico, reacción que es posible en el organismo.
- Es un polímero de características mecánicas y procesamiento maleables, pudiendo así conseguir diferentes tamaños y formas para la encapsulación de diferentes fármacos.
- Es posible modificar su cubierta con diferentes sustituyentes para proporcionarle propiedades adicionales como puede ser mayor tiempo en el torrente sanguíneo, activación de la respuesta humoral o metabolización en un tejido localizado.
- Su degradación puede controlarse añadiendo monómeros de D-lactida a la cadena principal del polímero.
- El ambiente ácido facilita la degradación del polímero, al añadir fármacos ácidos o básicos y/o aditivos en gran medida se mejora la cinética de degradación.

5.2 Formas farmacéuticas.

Las principales formas farmacéuticas utilizadas son las micropartículas y nanopartículas. Sin embargo, también se ha utilizado para realizar hilos de sutura, que fue la primera aplicación que tuvo, en dispositivos como implantes, injertos de tejidos, prótesis y membranas bicapa.

- Micro/nanopartículas

Las micropartículas pueden obtenerse mediante los métodos de evaporación de solvente ya sea por emulsión única o doble, separación de fases (coacervación) y el secado por pulverización.

La coacervación es un método dedicado a la preparación de formulaciones encapsuladas de polímeros biodegradables de tamaño micrométrico mediante técnicas de separación de fases líquido-líquido. Este método produce dos fases líquidas (separación de fases) que incluyen un polímero que contiene una fase coacervada y una fase líquida sobrenadante que tiene escasez de polímero. El fármaco disperso/disuelto en la solución de polímero se recubre con un coacervado. Por tanto, el proceso incluye tres pasos:

1. Separación de fases de la solución de polímero de recubrimiento.
2. Adsorción de coacervados alrededor de las partículas de fármaco y
3. Templado de microesferas

La solución se prepara mezclando el polímero y el disolvente en una proporción adecuada. Los fármacos hidrófilos, como pueden ser péptidos y proteínas, se disuelven en agua y luego se dispersan en una solución de polímero (emulsión anhidra). Los fármacos hidrófobos, como los esteroides, se pueden disolver o dispersar en una solución de polímero (emulsión o/w). Mientras se agita, el medio orgánico se añade gradualmente a la fase polímero-disolvente para extraer el polímero disolvente, lo que conduce a la separación de fases del polímero, formando así un coacervado ligero de gotitas que contienen fármaco. El tamaño de las gotas se puede controlar cambiando la velocidad de agitación y la temperatura del sistema. Luego, el sistema se sumerge rápidamente en un medio insoluble para templar estas gotas. El tiempo de inmersión en el baño de enfriamiento controla el espesamiento y la dureza de las gotas. La forma final de

las microesferas se recoge lavando, tamizando, filtrando, centrifugando o liofilizando. Los parámetros de procesamiento que incluyen la composición del disolvente, la temperatura de enfriamiento, la concentración de polímero y, el tiempo de enfriamiento afectan la morfología y el tamaño de las microesferas.

Las técnicas de preparación de micropartículas mencionadas anteriormente se pueden modificar ajustando los parámetros de procesamiento para producir nanopartículas. El método más común para preparar nanopartículas es la técnica de evaporación de emulsión de solventes. Las nanopartículas también se pueden sintetizar mediante nanoprecipitación. El polímero y el fármaco se disuelven en acetona y luego se añaden a la solución acuosa que contiene Pluronic F68. La acetona se evapora a una temperatura adecuada y presión reducida, dejando atrás las nanopartículas encapsuladas por el polímero del fármaco. La salinización es otro método en el que se forma primero una emulsión de agua en aceite que contiene un polímero, un disolvente (generalmente no clorado, como la acetona), una sal y un estabilizador. Después se agrega agua a la solución hasta que el volumen sea suficiente para que la acetona se difunda en el agua para obtener una formulación de nanopartículas.

El PLGA se degrada siguiendo una cinética de segundo orden basada en la concentración de enlaces éster y agua. A medida que la hidrólisis o auto catálisis avanza, el peso molecular promedio en número (M_n) del polímero disminuye a medida que aumenta la concentración del extremo de la cadena (CE), que se puede cuantificar mediante la siguiente ecuación.

$$CE = \frac{X}{V} = \frac{\rho}{M_n} = \frac{\rho}{N \cdot M_0}$$

Donde X: número total de cadenas; V: volumen; ρ : densidad de las muestras; M_0 : peso molecular del monómero; N: grado de polimerización. La reacción de hidrólisis de segundo orden se puede describir como sigue:

$$\frac{dCE}{dt} = k_2 C_e C_w$$

Donde k_2 : constante de velocidad; C_e : concentración de enlaces éster; C_w : concentración de agua;

Juntando las ecuaciones anteriores, el M_n se puede calcular siguiendo la ecuación de hidrólisis de segundo orden.

$$\frac{1}{M_n} = \frac{1}{M_{n_0}} + \frac{1}{M_0} k_2 C_e t$$

Donde M_n : peso molecular promedio en número en el tiempo t ; M_{n_0} : peso molecular medio numérico inicial antes de iniciar la reacción de hidrólisis. En el caso de degradación auto acelerada o autocatálisis, la tasa de degradación es proporcional a la concentración de enlaces de cadena y, la concentración de enlaces de hidrólisis y enlaces de agua, como se muestra a continuación:

$$\log M_n = \log M_{n_0} - k_3 C_e C_w t$$

donde k_3 : constante de velocidad de auto catálisis.

Los diferentes fármacos liberados de la matriz de PLA o PLGA son la suma de la masa y los mecanismos de difusión superficial y, corrosión de la matriz. Cuando la pérdida de peso es mínima, la liberación del fármaco se produce principalmente por difusión. Esto se puede describir mediante la siguiente ecuación::

$$\frac{\partial C(r, t)}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 D(M_w) \frac{\partial C(r, t)}{\partial r} \right)$$

donde C : concentración de fármaco; t : tiempo; r : posición radial; $D (M_w)$: difusividad del fármaco dependiente del peso molecular del polímero.

Cuando el polímero se formula como MP o NP, la liberación del fármaco se ve afectada por la distribución del tamaño, que puede describirse por la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{M_{\infty}} \frac{\partial M_{drug}}{\partial r} = f(r; \lambda, k) = \frac{k}{\lambda} \left(\frac{r}{\lambda}\right)^{k-1} \exp\left(-\left(\frac{r}{\lambda}\right)^k\right)$$

donde r : es el radio de la partícula; M_{∞} : masa total de drogas en la población; $M_{fármaco}$: masa del fármaco en una partícula

En los últimos años, la investigación ha girado en torno al diseño de partículas de PLGA modificadas en la superficie, que tienen mayor vida media en el torrente sanguíneo [72]. El método más relevante para evitar el reconocimiento de RES es la PEGilación, enmascarando la hidrofobicidad de las partículas y utilizando un cepillo de PEG hidrófilo para impartir propiedades de sigilo [73]. Los estudios experimentales también han demostrado otras propiedades beneficiosas de las partículas PEGiladas, como reducir la agregación y mejorar la estabilidad y la eficacia biológica [74] Además, se han desarrollado NP acopladas con ligandos como péptidos, anticuerpos y ligandos de nucleótidos para mejorar la localización y la capacidad de direccionamiento activo de órganos o células específicos de considerable interés.

La terapia génica también ha alcanzado muchos logros en la liberación de genes de varios ácidos nucleicos como ARNm [75], ARNip y microARN. Estos ácidos nucleicos pueden introducir genes que, codifican proteínas funcionales que son esenciales para prevenir la progresión de la enfermedad o prevenir la traducción de ARNm específicos para eludir posibles efectos tóxicos. Existen muchos obstáculos tras la administración de ácidos nucleicos como la endocitosis, la presencia de la enzima nucleasa, la inestabilidad del ácido nucleico y la membrana biológica. Estos inconvenientes pueden paliarse con la incorporación de los ácidos nucleicos en nanopartículas o micropartículas de PLGA. [76][77]

La inyección subcutánea e intramuscular de partículas de PLGA forma cápsulas fibrosas alrededor del lugar de administración. Además, en este caso, los macrófagos engullirán una parte de las microesferas en un proceso dependiente del tamaño.

- Implantes

Las técnicas de preparación de implantes se pueden organizar en:

- Moldeo por compresión y fundición con disolvente: es un método para implantar o insertar preparaciones macroscópicas de tamaño milimétrico para el tratamiento farmacológico a largo plazo. Las macro formulaciones de gran tamaño actúan como reservorios de medicamentos que pueden administrarse durante intervalos de tiempo más prolongados. La mezcla de polímero y fármaco se disuelve en un disolvente común en la proporción deseada y el disolvente se filtra a una temperatura de aproximadamente 60°C hasta que se evapora por completo. La estructura final es un complejo de fármaco y polímero. A continuación, el material moldeado con disolvente se moldea por compresión con la geometría deseada a aproximadamente 80°C y una presión de 25.000 libras por pulgada cuadrada (psi), con una densidad final de 1g/cc. El implante se puede inyectar por vía subcutánea en el cuerpo. En comparación con la implantación de microesferas/nanoesferas, la principal ventaja de este método está relacionada con la capacidad de manejar eventos adversos, porque el implante retiene la reversibilidad que no tiene el mecanismo de deposición. Sin embargo, dado que se requiere gran cantidad de disolventes orgánicos y agentes activos (API) para combinar fármacos y polímeros para fabricar gránulos, estos métodos no son ideales en la producción a escala industrial y se enfrentan al riesgo de desnaturalización del fármaco/proteína por el uso de disolventes orgánicos en el proceso de encapsulación. Además, lleva mucho tiempo eliminar completamente el disolvente del material resultante y, no son procesos continuos, lo que aumenta la diferencia en la composición del implante de lote a lote y el coste de la fabricación. Se requiere mucho

tiempo para la eliminación completa del solvente del material resultante y, no son procesos continuos, lo que puede aumentar la variación de un lote a otro en la composición de los implantes, así como el costo de fabricación.

- Extrusión: es un proceso continuo de extracción de la mezcla de polímero y fármaco a través de la matriz, sin el uso de solventes para hacer un implante con un perfil transversal fijo. Este método requiere una extrusora y una mezcla de polímeros y fármacos con el material de alimentación requerida del tamaño de una micra. En este proceso, la mezcla de polímero y fármaco se calienta a un estado semilíquido mediante una combinación de elementos calefactores y esfuerzo cortante del tornillo de extrusión. Los tornillos empujan la mezcla a través del molde. El extruido resultante se enfría y solidifica, y luego se corta a la longitud requerida para su uso en implantes u otras aplicaciones. La exposición del fármaco a altas temperaturas puede ser perjudicial debido a la desnaturalización. Por lo tanto, basado en el punto de fusión, la estabilidad polimórfica y la interacción química con PLGA, el proceso de extrusión limita los fármacos utilizables [5].

El PLGA se usa a menudo como agente formador de matriz en sistemas de administración de fármacos controlados por vía parenteral. Se ha propuesto la N-metilpirrolidona (NMP) como disolvente soluble en agua para el sistema de inyección *in situ* del polímero [78]. Un ejemplo de su uso en implantes *in situ* es el tratamiento de la periodontitis con clorhexidina e ibuprofeno [79]. La velocidad de liberación (figura 4) debe controlarse simultáneamente durante varias semanas, especialmente cuando se utilizan diferentes formas de fármacos para estudiar los efectos de la solubilidad del fármaco y su carga inicial.

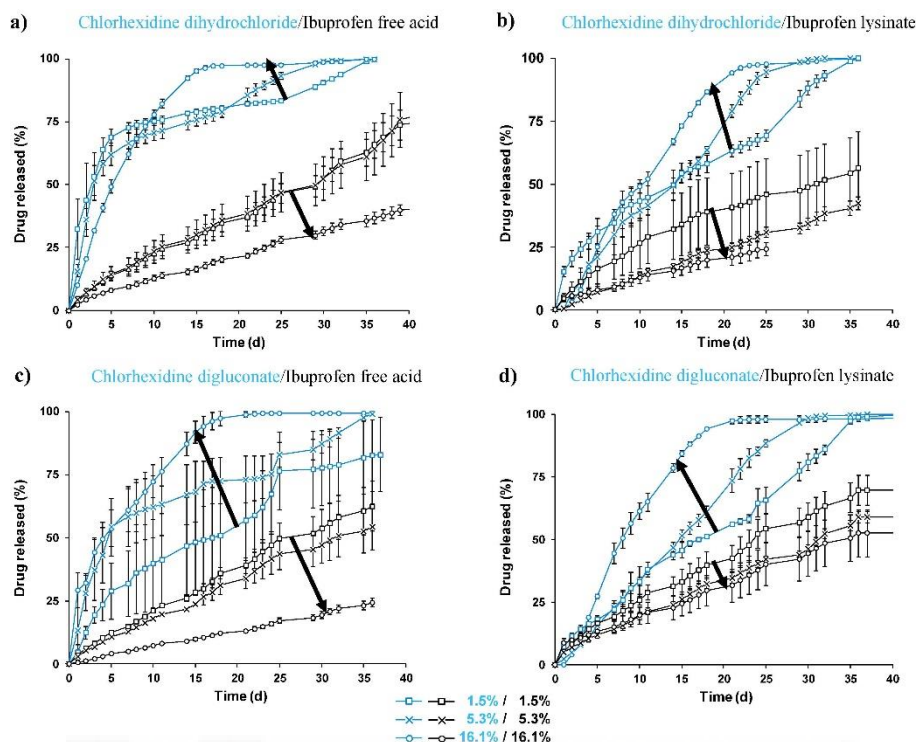


Figura 4. Tasas de liberación de fármaco dual en implantes de formación *in situ* cargados con: (a) diclorhidrato de clorhexidina e ibuprofeno, (b) diclorhidrato de clorhexidina y lisinato de ibuprofeno, (c) digluconato de clorhexidina e ibuprofeno y (d) digluconato de clorhexidina y lisinato de ibuprofeno. Inicialmente las cargas monitorizadas fueron de 1,5% / 1,5%, 5,3% / 5,3%, 16,1% / 16,1%, como se indica. Las curvas azules determinan el patrón de liberación de clorhexidina, las curvas negras, el de ibuprofeno.

Los implantes basados en PLGA formados *in situ* proporcionan un potencial interesante para la administración de fármacos antisépticos y antiinflamatorios de doble control. Como anteriormente se describe, la principal ventaja de los implantes está relacionada con su capacidad para manejar los efectos adversos, ya que el implante puede revertirse al contrario que los sistemas de nanopartículas y micropartículas que producen deposiciones en el organismo. Además, también pueden usarse de manera local para ciertas patologías.

Los stents y los hidrogeles son otra forma farmacéutica, en la que podemos encontrar NP/MP de PLGA. Un andamio o stent es una estructura tridimensional porosa que se usa comúnmente para fortalecer los huesos fabricados con tejidos. El andamio debe tener suficiente resistencia mecánica para soportar el crecimiento de nuevos huesos; buena biocompatibilidad, permitiendo que las células crezcan en su superficie sin ser rechazadas por el cuerpo humano; una porosidad adecuada para permitir el crecimiento de células relacionadas con los huesos; baja toxicidad; ser biodegradable con productos de degradación no tóxicos; debe ser capaz de inducir la diferenciación osteogénica de las células madre relacionadas con los huesos, y eventualmente ser reemplazado por huesos nuevos. Además, la liberación o entrega de los factores de crecimiento *in situ* debe ser prolongada en el tiempo. Por lo tanto, las NP/MP se usan en estos andamios para liberar suficiente flujo de estas biomoléculas de señalización y retener su estructura funcional. En hidrogeles (como en stents), se puede incorporar NP/MP para liberar fármacos de forma continua. Los hidrogeles pueden estar compuestos por diferentes sustancias químicas, como ácido quitosano-tioglicólico (Ploxamer 407), gelatina o poliacrilato fumarato [58]. Los hidrogeles se pueden utilizar en una variedad de patologías como la regeneración ósea [58], periodontitis [79], diabetes tipo 1 [70], etc.

Las micropartículas y nanopartículas se utilizan mayoritariamente para la encapsulación de fármacos para su posterior liberación en el organismo de manera controlada. Las nanopartículas pueden llegar a tejidos que, por tamaño, las micropartículas no alcanzan como el tejido óseo o el sistema nervioso central.

Las partículas de Janus son partículas heterogéneas, compuestas por dos hemisferios diferentes de materiales distintos, que proporcionan características o funciones diferentes para cada hemisferio. La palabra *Janus* proviene de un dios de dos cabezas de la mitología romana antigua, ya que las partículas de *Janus* tienen una estructura parecida con dos hemisferios, lo que las hace adecuadas ante otros tipos de partículas en aplicaciones como la administración de dos fármacos diferentes simultáneamente o la encapsulación de fármacos y agentes

de imagen (figura 2K). Estas partículas pueden sintetizarse usando un método de plataforma de micro fluidos o un sistema de nanoprecipitación fluídica. En las partículas de *Janus* cada hemisferio puede personalizarse de acuerdo con necesidades específicas, es decir, medicamentos con diferente solubilidad. En el caso de esferas hidrófilas y esferas hidrófobas, estas partículas pueden estabilizar la emulsión individual o en o/w/w. Se pueden usar polímeros con diferentes grupos terminales para formular partículas con dos superficies y, además, pueden cubrirse con varios grupos químicos. Después, cada superficie puede modificarse adicionalmente con un agente de formación de imágenes o un ligando objetivo. Esta modificación hace posible que las partículas de *Janus* puedan ser portadores bifuncionales o multifuncionales, aunque es difícil ajustar las características de un hemisferio sin cambiar el otro. Hay varias formas de resolver este problema, incluida la cobertura temporal de un lado de la partícula o la impresión por micro contacto.

Este tipo de partículas se pueden sintetizar mezclando dos polímeros con diferentes afinidades por el agua, como PLGA y policaprolactona (PCL). Así se puede aumentar la carga de fármacos hidrófilos y lipófilos al combinar dos polímeros diferentes, como lo muestran Li et al [17]. Además, el PLGA y PCL tienen tasas de degradación distintas, lo que ofrece la posibilidad de liberación y administración controlada de fármacos. Algunos ejemplos de estas situaciones son el tinte de las partículas de *Janus* con rodamina B, que tiñe principalmente el PLGA, lo que significa que se distribuye selectivamente por las partículas. Otro ejemplo es la combinación de administración de fármacos e imágenes, como las nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 y el fármaco EuLa3 (Bim) 12 marcado con fluorescencia [18], lo que dio como resultado microesferas que tenían simultáneamente propiedades magnéticas y fluorescentes. Entre sus aplicaciones biomédicas se encuentran la administración de fármacos, la biodetección y la bioimagen. [4] [16].

5.3 Uso del PLGA en formulación de vacunas.

Se entiende por vacuna cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos. Puede

tratarse, por ejemplo, de una suspensión de microorganismos atenuados o muertos, o productos o derivados de microorganismos. Se utilizan para reforzar el sistema inmunitario y prevenir enfermedades graves y potencialmente mortales. Hay diferentes tipos de vacunas:

1. Vacunas de microorganismos vivos: usan la forma del microorganismo debilitada (o atenuada). La vacuna contra el sarampión, las paperas y la rubéola son algunos ejemplos.
2. Vacunas muertas (inactivadas): se hacen de una proteína u otros pequeños fragmentos tomados de un virus o bacteria.
3. Vacunas toxoides: contienen una toxina o químico producido por el microorganismo. Estas vacunas crean inmunidad ante los efectos dañinos de la infección, en lugar de a la infección en sí.
4. Vacunas biosintéticas: contienen sustancias artificiales que son muy similares a fragmentos de virus o bacterias.
5. Vacunas tolerogénicas: están destinadas a inhibir las respuestas inmunitarias específicas al antígeno.

La vacunación consiste en la administración de antígenos con el fin de provocar una respuesta inmune adaptativa específica del antígeno y conferir protección a largo plazo contra la exposición posterior al antígeno.

Las micropartículas/nanopartículas (MP/NP) de PLGA han demostrado ser un sistema de administración de vacunas prometedor y, debido a su excelente seguridad en humanos, han sido aprobadas por la FDA para la gestión de vacunas y fármacos.

Un ejemplo de vacunación microbiana viva es la encapsulación de CpG-ODN en nanopartículas de polímero hueco, que es un agonista del receptor 21 tipo toll aviar (TLR21). El CpG-NP es preparado con éxito con un diámetro medio de 164 nm que puede liberar CpG de forma continua durante 96 horas. Usando un modelo aislado de células dendríticas derivadas de médula ósea de pollo (chBMDC), CpG-NP se fagocitó eficazmente y se encontró que induce la maduración de las células dendríticas (DC), promueve la formación dendrítica y regula positivamente el CD40, CD80 y CCR. Además, se incrementó la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-12 e IFN- γ y, se encontró que la chBMDC tratada con CpG-NP

estimulaba 53/84 genes relacionados con el sistema inmunológico, mientras que solo 39 estaban activados cuando se estimulan en células libres tratadas con CpG. Estos genes regulados positivamente indican un sesgo inmune contra el sesgo de las células T colaboradoras 1 (Th1) y evidencia una mejora inmune de la mucosa después de la vacunación con CpG-NP. Las chBMDC tratadas con CpG-NP tiene un efecto protector sobre las células dendríticas foliculares (DF-1) contra el virus de la influenza aviar H6N1 causante de infecciones. Este estudio propone una nueva preparación, que demostró tener capacidad de estimulación inmunológica eficaz y duradera en pollos *in vitro* e *in vivo* [19]. Otro ejemplo es la encapsulación de polisacáridos de *Angelica Sinensis* (ASP), NP encapsulados con polietilenamina (PEI) y encapsulados en (ASP-PLGA/ovoalbúmina-PEI) como un sistema de administración de adyuvante de vacuna con el potencial de inducir respuestas inmunes celulares y humorales fuertes en un largo periodo de tiempo. [40][41]

Las partículas de PLGA protegen a los péptidos/proteínas cargados de la degradación proteolítica y les confiere una vida media plasmática adecuada. El PLGA no tiene ningún efecto adverso sobre la función de las DC como la maduración, la migración, la secreción de citoquinas y las propiedades coestimuladoras. Los sistemas de administración de vacunas en partículas de tamaño nano/micro tienen la capacidad de administrar simultáneamente tanto el antígeno como el inmunopotenciador a las mismas DC o macrófagos. La coadministración del antígeno y del inmunostimulante (IS) puede aumentar la potencia, reducir la dosis de adyuvante y, en consecuencia, minimizar la toxicidad del IS. Sin embargo, la aplicación de partículas de PLGA enfrenta algunos desafíos que pueden afectar la integridad e inmunogenicidad de las proteínas. Se han desarrollado muchas estrategias para paliar este tipo de desafíos, como por ejemplo métodos para la preparación de MP/NP cargados con proteínas como son el método de evaporación de emulsificación-solvente, secado por esterilización, coacervación, nanoprecipitación, enfoques de microfluidos o tecnología PRINT. Para que la encapsulación sea eficaz la alta capacidad de carga como la relación adecuada entre la proteína deseada y las partículas de PLGA son parámetros cruciales. Las partículas de PLGA ofrecen

nuevos enfoques de administración de vacunas que pueden estimular la inmunidad innata y dirigir el procesamiento intracelular de los antígenos dentro de las CD hacia la vía de presentación cruzada. La adsorción de antígeno en la superficie de MP/NP preformados como un método desarrollado recientemente es el mejor método para superar cualquier inconveniente. Las células “*natural killer*” (NK) se pueden activar mediante la co-entrega de antígenos y ligandos TLR a través de PLGA MP/NP. Por lo tanto, la encapsulación de inmunoestimuladores junto con antígenos da como resultado una respuesta superior en comparación con las formulaciones solubles de antígeno/inmunoestimulador, puede conducir a vacunas más eficaces. Además, los agentes dirigidos a DC se pueden incorporar a las partículas de PLGA y, posteriormente las células CD8⁺ se pueden estimular mediante presentación cruzada y maduración de DC. La aplicación de la combinación de restos de direccionamiento de DC y ligando TLR en partículas de PLGA puede hacer que estas partículas sean un enfoque prometedor para las formulaciones de vacunas contra el cáncer, ya que se activan las células T CD4⁺, CD8⁺ y también las células NK. [20]

La invasión de patógenos a través de la superficie de la mucosa del huésped requiere una inducción adicional de inmunidad celular, humoral y mucosa sistémica para proporcionar protección contra el organismo patógeno. Se aplicaron diferentes estrategias como la decoración de la superficie de la partícula PLGA con péptido RGD que se dirige a la integrina $\beta 1$ en las células M, UEA-1, y LTA que interactúan con los receptores α -1-fucosa de las células M para apuntar partículas a las células M. Muchas investigaciones han confirmado la inducción de la inmunidad de la mucosa dirigiendo partículas de PLGA cargadas con antígeno a las células M, lo que sugiere que diversas enfermedades infecciosas pueden tratarse mediante la administración oral de partículas de PLGA dirigidas a células M. Además, la inmunidad de la mucosa se puede lograr mediante la administración nasal de quitosano y partículas de PLGA modificadas en la superficie. [39]

Otra aplicación de las partículas de PLGA son las vacunas tolerogénicas. A diferencia de las vacunas inmunogénicas que provocan respuestas inmunitarias

contra un patógeno, las vacunas tolerogénicas, también conocidas como vacunas inversas, están destinadas a suprimir la respuesta inmunitaria patológica tanto a alérgenos como a autoantígenos. Un papel clave en la supresión de la respuesta inmune lo desempeñan las células T reguladoras (Treg) que incluyen células Treg naturales (nTreg), que se diferencian en el timo y reconocen principalmente autoantígenos, y células Treg inducidas (iTreg), que se diferencian en la periferia de diferentes tipos de células Th efectoras. Las Treg ejercen su actividad a través de varios mecanismos, incluida la secreción de citocinas antiinflamatorias, como IL-10 y TGF- β , y la alteración metabólica y la modulación de la maduración y función de las DC. Se ha detectado una disminución en el número y una función defectuosa de Treg en varias enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Dado que las vacunas de dosis alta, las vías de administración intravenosa y mucosa, la exposición prolongada a la vacuna y la presencia de IL-10 y TGF- β son determinantes tolerogénicos bien establecidos, la tolerancia periférica inducida por la vacuna tolerogénica depende estrictamente de la dosis de antígeno, vía de administración, tiempo de exposición al antígeno y medio de citocinas. En el caso de la vacunación tolerogénica, los NP pueden utilizarse como plataformas para modular las dosis y tiempos de administración no solo de los antígenos sino también de aquellas sustancias necesarias para promover la tolerancia (adyuvantes tolerogénicos). Algunas enfermedades autoinmunes en las cuales se ha probado el tratamiento con PLGA NP son la encefalomiелitis autoinmune, artritis reumatoide, diabetes tipo 1 (DT1) y las alergias. [19] [20] [21].

La encefalomiелitis autoinmune experimental es un modelo animal de EM ampliamente utilizado porque comparte varias características con la enfermedad humana, incluida la disfunción neurológica y la inflamación perivascular en el SNC. La EAE se puede inducir en varias especies de mamíferos inmunizando animales con homogeneizado del SNC o proteínas de mielina, como la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG), proteína básica de mielina (MBP) y proteína proteolípida (PLP), o utilizando pequeños péptidos derivados de estas proteínas. El uso de diferentes protocolos de inmunización y

antecedentes genéticos permite imitar el recidivante/remitente o el curso progresivo. [22] Casey et al [67] en experimentos preliminares, se encontró que las NP cargadas con PLP₁₃₉₋₁₅₁ reducen la expresión de moléculas coestimuladoras en DC de médula ósea inmaduras y maduras in vitro. Estos autores compararon la actividad tolerogénica de PLGA_{PLP 139-151} NPs-TGF- β con la de PLGA_{PLP 139-151} NPs con administración intravenosa o bien subcutánea. Los resultados mostraron que ambos tipos de NP mejoran los síntomas de EAE cuando se administran por inyecciones intravenosas, mientras que sólo PLGA_{PLP 139-151} NPs-TGF- β eran eficaces después de la administración subcutánea.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción progresiva del cartílago articular. Yu et al [69] realizaron un estudio in vivo con ratas a las que se les induce la artritis reumatoide para tratarlas con MP de PLGA cargadas conjuntamente de ketoprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo, y microRNA-124, que es un nuevo agente terapéutico prometedor para la AR. Las ratas se dividen en 4 grupos diferentes al azar (n=6) y se inyectan por vía subcutánea con diferentes formulaciones: grupo 1 (GP1): se tratan con 0.5 ml de carboximetilcelulosa sódica al 0.5% (CMC-Na); GP2: se tratan con una dosis única de MP cargadas con ketoprofeno y microRNA-124 (KMMS) en 0.5 ml de CMC-Na al 0.5%; GP3: se tratan con una dosis única de 36 mg de MP cargadas con microRNA-124 (MMS) en 0.5 ml de CMC-Na al 0.5%; GP4: se tratan con una dosis única de 36 mg de MP cargadas con ketoprofeno (KMS) en 0.5 ml de CMC-Na al 0.5%. En paralelo se tratan ratas normales con 0.5 ml de CMC-Na al 0.5% sirviendo de grupo control. Los resultados indican que las KMMS reducen eficazmente la inflamación inducida por artritis.

La DT1, tanto en humanos como en ratones diabéticos no obesos (NOD) resulta de una ruptura de la auto tolerancia que se caracteriza por la destrucción de las células β pancreáticas mediada por células T. Lewis et al [71] desarrollan un sistema combinado de MP de doble tamaño para modular las células dendríticas y prevenir la DT1 en ratones NOD prediabéticos, el estudio se realiza en ratones NOD hembra de 4 semanas de edad que se dividen en 5 grupos (n=13). Grupo

A: solo MP descargados; Grupo B: MP de GM-CSF + MP de insulina B; Grupo C: MP de vitamina D3+ MP TGF- β 1 + MP de insulina B; Grupo D: MP Vit D3 + MP TGF- β 1 + MP GM-CSF + MP insulina B; Grupo E: MP de insulina B. Los ratones se inyectaron de forma subcutánea dos veces en un sitio anatómicamente proximal a los ganglios linfáticos pancreáticos. *In vitro*, esta formulación de combinación de MP promueve un fenotipo de DC que suprime fuertemente las células T alogénicas, incluso tras la estimulación de lipopolisacáridos solubles (LPS). Lo más importante es que se observó protección contra la DT1 en ratones NOD vacunados con el complemento completo de MP (grupo D).

Otro enfoque consiste en utilizar NP para administrar sustancias inmunosupresoras en el tejido diana de la enfermedad autoinmune, sin incluir autoantígenos en las NP. Este enfoque puede contemplarse como una posible vacunación tolerogénica en la que los autoantígenos ya están presentes en el tejido y el agente inmunosupresor funciona localmente como un adyuvante inverso que rompe los circuitos autoinmunitarios dentro de los tejidos dañados. Por ejemplo, la inyección intravenosa de NP de PEG-PLGA multifuncionales con metotrexato encapsulado [68] permitió la liberación directa de metotrexato en el tejido inflamado y suprimió la artritis inducida por adyuvantes. La administración perineural bilateral de NP de PLGA cargadas con lovastatina [66] atenuó significativamente la gravedad clínica de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo de síndrome de Guillain-Barré y polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, y protegió a los animales de los déficits morfológicos y funcionales de los nervios periféricos. Y, la administración subcutánea de un hidrogel peptídico con la incorporación de MP de PLGA cargadas con insulina, que contiene secuencias de GM-CSF y CpG que se utilizan para reclutar y activar células inmunes, previno el desarrollo de DT1 en ratones NOD, un modelo de ratón de DT1 espontánea. [70]

* CpG-ODN: oligodesoxinucleótidos CPG (desoxinucleótido citosina trifosfato ("C") y desoxinucleótido guanina trifosfato ("G"), la p se refiere al enlace

fosfodiéster entre nucleótidos consecutivos), GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

5.4. Ventajas del uso del PLGA en el tratamiento del cáncer.

Se define neoplasia como el crecimiento sin control o la no muerte de las células en el momento indicado. Las neoplasias son benignas (no cancerosas) o malignas (cancerosas). Las masas benignas a veces se multiplican en exceso, pero no se diseminan ni invaden los tejidos cercanos u otras partes del cuerpo. Las masas malignas suelen diseminarse o invadir los tejidos cercanos y, también es posible que se extiendan a otras partes del cuerpo a través de la circulación sanguínea y el sistema linfático (metástasis).

Hay muchos tratamiento para el cáncer, este dependerá del tipo de neoplasia que se detecte y de qué tan avanzada esté. La mayoría de los tratamientos, son combinaciones de varios tipos como la cirugía con quimioterapia o radioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida o terapia con hormonas. Los cáncer más comunes en el mundo son:

- Cáncer de pulmón (2.09 millones de casos/año)
- Cáncer de mama (2.09 millones de casos/año)
- Cáncer colorrectal (1.80 millones de casos/año)
- Cáncer de próstata (1.28 millones de casos/año)
- Cáncer de piel (1.04 millones de casos/año)
- Cáncer de estómago (1.03 millones de casos/año)

Aunque sean los más comunes, no significa que sean los que más muertes generan. La prevalencia de esta enfermedad varía según la zona geográfica, el sexo, el medioambiente, la situación personal, el perfil genético... El tratamiento es diferente según el tipo de cáncer que se sufra, además, la forma de administración también cambia conforme el tratamiento se tolere, ya que son tratamientos muy agresivos para el organismo.

Las nanopartículas han surgido como un vector sólido para la administración de fármacos y la transfección génica. A diferencia de la transfección basada en el sistema viral que puede causar problemas de seguridad debido a la

inmunogenicidad, el PLGA es uno de los materiales aprobados por la FDA. Las NP de PLGA pueden evitar el ataque del endolisosoma y así proteger la carga de la degradación o liberación temprana. Para cargar plásmidos en NP hay dos métodos: atrapamiento físico y adsorción electrostática. El atrapamiento físico tiene limitaciones como eficiencia limitada en el atrapamiento, baja eficiencia de liberación y, daño por apertura del anillo del ADN/rotura del ADN causado por acciones físicas/químicas durante el proceso sintético para una transfección efectiva. La adsorción electrostática surge como una mejor opción para la transfección, se consigue por la unión de PEI ramificada y PLGA mediante una reacción de carbodiimida. La eficiencia de la transfección de genes se puede mejorar significativamente si la NP posee la capacidad de focalización activa en lugar de la que posee solo la capacidad de focalización pasiva basada en la permeabilidad mejorada del tumor y el efecto de retención que también, de alguna manera, ayuda con la acumulación de nanopartículas.

La nanomedicina se puede usar para gran variedad de terapias contra el cáncer, incluida la administración de fármacos dirigidos a tumores, la hipertemia y la terapia fotodinámica, proporcionando ventajas como poder llegar al sistema nervioso central atravesando la barrera hematoencefálica. Las terapias contra el cáncer implican la administración sistémica de fármacos en el cuerpo o su absorción oral, los cuales pueden dañar los tejidos sanos por una acumulación significativa fuera del objetivo y, por tanto, generar efectos secundarios graves. La acumulación fuera del objetivo limita la dosis que se puede administrar [35]. La orientación pasiva, se da por una acumulación en el tejido tumoral debido a la permeabilidad y fugas de la vasculatura tumoral y la falta de drenaje linfático funcional, un ejemplo de este tipo de orientación se demuestra en el artículo de Rafiei et al. [36]. Sin embargo, este tipo de orientación tiene varias limitaciones (efecto EPR) que varían según el paciente, tumor, tiempo... [37]

En la orientación activa, se pueden unir ligandos específicos a la superficie de las NP, que se unen a receptores o antígenos en las células tumorales, el microambiente tumoral o la vasculatura tumoral. Sin embargo, la orientación activa también puede inducir efectos adversos: tras la modificación de la

superficie, el tiempo de circulación a menudo disminuye debido al aumento de la opsonización y el reconocimiento por parte del MPS. Además, se ha afirmado que la expresión del receptor en las células tumorales puede cambiar con el tiempo y, junto al cambio de vía entre diferentes receptores, los receptores alternativos pueden regularse positivamente en las células tumorales. [38]. Estos hechos animaron a los investigadores a desarrollar NP que se dirigen a receptores que se sobreexpresan en diferentes estados de diferenciación de células tumorales.

La orientación magnética es otra estrategia de dirección (activa). En este enfoque, las NP se cargan con compuestos magnéticos, que se acumulan en el sitio del tumor mediante la aplicación de un campo magnético externo [36]. Al-Jamal et al con un enfoque similar [39] mostraron inhibición del crecimiento tumoral en ratones portadores de tumores de cáncer de colon CT26 después de la administración de fármacos dirigidos magnéticamente de NP de PLGA-PEGilado de circulación prolongada cocargadas con docetaxel (DTX) y cantidades variables de SPION. Además, Cui et al [40] informaron que la combinación de focalización activa y magnética aumentó la acumulación de NP y la captación celular.

Otra terapia contra el cáncer es la terapia foto-activada, se puede utilizar como un enfoque crucial para el tratamiento de varios tipos de cáncer al irradiar con luz los sitios tumorales enriquecidos con fotosensibilizador, las especies de oxígeno reactivo generadoras pueden matar directamente células cancerosas. [33]. Es importante destacar que los fotosensibilizadores hidrófobos se pueden integrar en los sistemas de administración de fármacos (DDS) basados en PLGA, lo que hace posible que los mecanismos contra el cáncer hidrófobos logren la administración dirigida al tumor. Este método es atractivo para la eliminación de tumores sólidos, que utilizan agentes absorbentes de luz para convertir la energía luminosa en energía térmica, por lo que la hipertemia local generada puede destruir las células cancerosas de manera irreversible sin causar daño a los tejidos sanos [41] [42] [43]. La terapia contra el cáncer activada por ultrasonido se centra en las NP/MP que liberan los quimioterápicos activados por ultrasonido y la eficiencia de la transfección genética mejorada por ultrasonido.

El ultrasonido enfocado de alta intensidad (HIFU) es factible, no invasivo y eficaz para el tratamiento de tumores sólidos [33]. Además del enfoque de la terapia de HIFU y campos magnéticos, la terapia desencadenada por radiofrecuencia se ha aplicado ampliamente en varios tipos de tumores. Zhang K et al [44] introdujeron el DL-mentol biocompatible (DLM) en una NP de PLGA para construir una NP basada en PLGA encapsulada en DLM.

Otras terapias utilizadas contra el cáncer son la terapia de genes y la inmunoterapia. Junto a los tratamientos quimioterapéuticos e inmunoterapias estándar la entrega de genes y el silenciamiento de genes son enfoques emergentes en el campo contra el cáncer. Un ADN de doble hebra o de una sola se usa para reemplazar un gen, mientras que el ARN de interferencia corto se usa típicamente para silenciar un gen. Cuando el cáncer se inicia por una mutación celular, los ARNi pueden inhibir genes responsables de la resistencia a múltiples fármacos y, en combinación con, por ejemplo, quimioterapias dirigidas, el mecanismo de autodefensa puede inhibirse [45]. El principal obstáculo en la terapia génica es la entrega de ácidos nucleicos (AN) grandes, cargados negativamente y muy frágiles al citoplasma celular, respectivamente, al núcleo celular. El PLGA se ha utilizado como portador para proteger y administrar AN [46], también se emplea en la edición del genoma a través de la tecnología CRISPR, lo que se utiliza para poder silenciar, eliminar o agregar genes existentes, como en el ejemplo de Liu et al [47]. La inmunoterapia contra el cáncer se puede realizar mediante vacunas contra el cáncer, terapia con citocinas, terapia de bloqueo de puntos de control, transferencia adoptiva de células T y terapia con células T del receptor de antígeno quimérico (CAR-T) [67]. Aquí, las NP basadas en PLGA no solo pueden proteger la degradación, sino que también pueden promover la acumulación pasiva por el efecto EPR y pueden facilitar estrategias de orientación activa adicionales mediante la modificación de la superficie. Sin embargo, la estimulación del sistema inmunológico, que permite el reconocimiento y el ataque de células malignas, no se basa únicamente en la acumulación de tumores, sino que también podría lograrse o potenciarse dirigiéndose a las células inmunitarias, por ejemplo, en el hígado, el bazo y los nodos linfáticos. Por lo tanto, la alta afinidad de muchas NP

por las células del sistema de fagocitos mononucleares, así como la captación de macrófagos, incluso podrían usarse para promover la respuesta inmune deseada. Las NP se pueden usar para administrar, por ejemplo, promotores de muerte celular inmunogénica (ICD), vacunas o inhibidores de puntos de control inmunológico mediante inyección intravenosa. Además, el uso de células como vacunas para la generación de respuestas inmunitarias adaptativas y eficaces está bien establecido en la inmunoterapia del cáncer. [51] [52] [53]. También se puede combinar la inmunoterapia con otras modalidades [49] [50] [32] [54].

Por último, el desarrollo de una nanoplataforma multifuncional con funciones diagnósticas y terapéuticas ha sido la tendencia de desarrollo futuro de la nanomedicina. [55]. Al aplicar la nanoplataforma que integra agentes de diagnóstico y terapéuticos al tratamiento de tumores, se puede monitorear todo el proceso de quimioterapia en tiempo real y, se puede monitorear si los fármacos quimioterapéuticos se administran efectivamente a los sitios del tumor. La posición, el cambio de tamaño y la metástasis de los tumores también se pueden controlar para determinar si los fármacos quimioterapéuticos son eficaces para eliminarlos. Muchos investigadores han desarrollado varios tipos de DDS basados en PLGA que se pueden utilizar para resonancia magnética, tomografía computarizada, imágenes de fluorescencia, imágenes de ultrasonido e imágenes foto acústicas (PA) de tumores para lograr la detección precisa de tumores, mientras que estos DDS basados en PLGA también pueden ser utilizado para cargar los fármacos terapéuticos como fármacos quimioterápicos, inhibidores de moléculas pequeñas, fotosensibilizadores, agentes fototérmicos y ARNip. Yang et al [56] ha desarrollado nanoburbujas de ultrasonido basadas en PLGA con inversión de carga para co-cargar DOX y ARNhc de P-gp para revertir la resistencia a los fármacos y mejorar el efecto antitumoral de los quimioterápicos, pudiendo usarse como un agente teranóstico disponible para la quimioterapia guiada por imágenes por ultrasonido y la terapia génica de tumores de resistencia a múltiples fármacos (MDR).

5.5 Otras patologías que utilizan el PLGA

El uso del PLGA está bastante extendido en el ámbito de la medicina. Además del tratamiento del cáncer y para la formulación de vacunas, este polímero se utiliza en otras patologías como pueden ser la regeneración ósea [57] [58], periodontitis [59], sistema nervioso central (SNC) [60], oftalmología [61], dermatología, aparato digestivo [64], aparato respiratorio [62], injertos, suturas y liberación controlada de fármacos para tratar infecciones causadas por diferentes microorganismos, e incluso, en veterinaria [63].

En la regeneración ósea, el PLGA se utiliza para sintetizar nuevas membranas bicapas o para la administración de fármaco en el lugar exacto. Normalmente los fármacos que se engloban en el PLGA para tratar esta patología son factores de crecimiento [58] que promueven el crecimiento y la diferenciación celular en la ingeniería y la regeneración ósea mediante su incorporación junto a las células en un andamio sólido o hidrogeles. La membrana de PLGA con prolactona (PLCL) [57] tiene una tasa de degradación menor en comparación con las membranas de PLGA comerciales, lo que indica la prolongación de sus funciones para apoyar la cicatrización de heridas, facilitar la regeneración ósea y bloquear la invasión indeseables de tejidos.

La periodontitis es una patología difícil de tratar ya que puede derivar de enfermedades sistémicas más graves, pero se ha visto que el PLGA es muy útil para la liberación de diferentes tipos de fármacos, pudiéndose tratar localmente la periodontitis.

Los trastornos neurológicos son un importante problema de salud pública mundial, debido a que los tratamientos que consiguen llegar hasta el sistema nervioso central son limitados, ya que el acceso está restringido por la barrera hematoencefálica. Las NP de PLGA son uno de los sistemas de administración de fármacos y genes más prometedores para cruzar la BBB. [60] Para que las estrategias de pretranscitosis aumenten la permeación de la BBB, las NP suelen estar recubiertas con tensioactivos para prolongar su tiempo en circulación, y estos enfoques se denominan modificaciones de primera generación. La adición

de ligandos específicos a las NP que están destinadas a mejorar el paso de la transcitosis a través de la BBB es característica de los enfoques de segunda generación. Los NP definitivos para aplicaciones traslacionales son NP PLGA multifuncionales diseñadas que combinan capacidades de primera y segunda generación y actividad posterior a la transcitosis contra enfermedades del SNC. Designamos estas terapias dirigidas al SNC capaces de cruzar la BBB como tercera generación. La evolución de los NP de PLGA diseñados de tercera generación ofrece una gran promesa para el suministro de sustancias bioactivas al SNC para tratar trastornos neurológicos. Al igual que en el SNC, las aplicaciones del PLGA en oftalmología y el aparato digestivo son para la administración de fármacos en el tejido indicado, como es el caso de las terapias intravítreas para tratar enfermedades oculares [61] [80] o el tratamiento de la colitis ulcerosa oralmente [64]. Las MP/NP de PLGA se utilizan para englobar fármacos y crear sistemas de liberación controlada.

Una de las administraciones posibles del PLGA es por vía nasal, pudiendo llegar al tejido pulmonar para tratar ciertas patologías como la fibrosis pulmonar idiopática [62]. En este caso, el PLGA sirve para que las moléculas de fármaco englobado no sean captadas por los macrófagos alveolares, llegando así al lugar de acción y liberando el fármacos.

En el caso de la veterinaria, la leishmaniasis visceral es una enfermedad potencialmente mortal que necesita nuevos fármacos o un sistema de administración de excelente biodistribución que reduzca la toxicidad [63]. El ácido betulínico es un candidato potencial antileishmanial, cuando sus limitaciones biofarmacéuticas son eludidas por los dispositivos biodegradables de nano escala PLGA recubiertos con lactoferrina.

A la vista de lo expuesto anteriormente, el PLGA es utilizado en amplitud de formulaciones biomédicas, donde su principal uso son las nanopartículas y micropartículas, las cuales se sintetizan con varios métodos, para sistemas de administración de fármacos, entre otras aplicaciones. Este sistema resulta un gran avance debido a que la estructura del PLGA puede modificarse con

ligandos, compuestos químicos y activadores que hacen posible que el tratamiento sea localizado, llegando a tejidos concretos, lo que es de gran utilidad en el tratamiento contra el cáncer, síntesis de vacunas, regeneración ósea y demás enfermedades. En los objetivos específicos como su empleo en el cáncer, se ha visto una disminución o inhibición del crecimiento de las células cancerígenas como explica, por ejemplo, Turek et al [65] y en las vacunas la respuesta inmune humoral y celular se ve aumentada con las formulaciones de PLGA tal como define Bruno et al [31].

6. Conclusión

Las conclusiones principales de este trabajo son:

- 1) La posibilidad de usar el PLGA en terapias médicas se debe, principalmente, a su biodisponibilidad, biodegradabilidad e inocuidad para el organismo, entre otras muchas cualidades, por ello la FDA acepta su uso para diferentes tratamientos.
- 2) Las formas farmacéuticas más comunes en las cuales se utiliza el PLGA son las micro y nanopartículas para la liberación sostenida de fármacos, pero el polímero se emplea también en diferentes tipos de formulaciones biomédicas como implantes, hilos de sutura, injertos de tejidos, prótesis, membranas bicapas, hidrogeles, etc. Hay gran variedad de técnicas para la síntesis de los compuestos de PLGA, pudiendo modificar su superficie con ligandos, sustancias químicas y activadores.
- 3) El uso del PLGA en vacunas permiten aumentar la respuesta inmune humoral y celular. En algunos casos, se combina el PLGA con sustancias inmunoestimulantes para exacerbar aún más la respuesta inmune.
- 4) La funcionalización de la superficie del PLGA permite dirigir las nano/micropartículas cargadas con fármacos citostáticos, proteínas o genes a los tejidos tumorales directamente, facilitando así un tratamiento localizado y disminuyendo o inhibiendo el crecimiento de las células cancerígenas de manera selectiva.

- 5) El uso del PLGA está bastante generalizado en clínica, siendo uno de los principales polímeros utilizado para el recubrimiento de fármacos. A parte de su empleo en terapias antitumorales y vacunas, también se usa en regeneración ósea, periodontitis, sistema nervioso central, oftalmología, dermatología, aparato digestivo, aparato respiratorio, injertos, suturas, enfermedades infecciosas y veterinaria.

Referencias

- [1] <https://es.wikipedia.org/wiki/PLGA>
- [2] Zhang J, Shishatskaya EI, Volova TG, da Silva LF, Chen GQ. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018 May 1;86:144-150. doi: 10.1016/j.msec.2017.12.035. Epub 2018 Jan 5. PMID: 29525089.
- [3] Swider E, Koshkina O, Tel J, Cruz LJ, de Vries IJM, Srinivas M. Customizing poly (lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2018 Jun;73:38-51. doi: 10.1016/j.actbio.2018.04.006. Epub 2018 Apr 11. PMID: 29653217.
- [4] Mir M, Ahmed N, Rehman AU. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017 Nov 1;159:217-231. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.038. Epub 2017 Jul 28. PMID: 28797972.
- [5] Elmowafy, E.M., Tiboni, M. & Soliman, M.E. Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. *J. Pharm. Investig.* 49, 347–380 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40005-019-00439-x>
- [6] Ding D, Zhu Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018 Nov 1;92:1041-1060. doi: 10.1016/j.msec.2017.12.036. Epub 2018 Jan 5. PMID: 30184728.
- [7] Arias, J. L., Unciti-Broceta, J. D., Maceira, J., Del Castillo, T., Hernández-Quero, J., Magez, S., ... & García-Salcedo, J. A. (2015). Nanobody conjugated

PLGA nanoparticles for active targeting of African Trypanosomiasis. *Journal of Controlled Release*, 197, 190-198.

[8] Cosco, D., Cilurzo, F., Maiuolo, J., Federico, C., Di Martino, M. T., Cristiano, M. C., ... & Paolino, D. (2015). Delivery of miR-34a by chitosan/PLGA nanoplexes for the anticancer treatment of multiple myeloma. *Scientific reports*, 5(1), 1-11.

[9] Allahyari, M., & Mohit, E. (2016). Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(3), 806-828.

[10] Lalani J, Patil S, Kolate A, Lalani R, Misra A. Protein-functionalized PLGA nanoparticles of lamotrigine for neuropathic pain management. *AAPS PharmSciTech*. 2015 Apr;16(2):413-27. doi: 10.1208/s12249-014-0235-3. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25354788; PMCID: PMC4370975.

[11] Sun, J., Zhang, L., Wang, J., Feng, Q., Liu, D., Yin, Q., ... & Jiang, X. (2015). Tunable rigidity of (polymeric core)-(lipid shell) nanoparticles for regulated cellular uptake. *Advanced materials*, 27(8), 1402-1407.

[12] Krishnamurthy, S., Gnanasammandhan, M. K., Xie, C., Huang, K., Cui, M. Y., & Chan, J. M. (2016). Monocyte cell membrane-derived nanoghosts for targeted cancer therapy. *Nanoscale*, 8(13), 6981-6985.

[13] Stolzoff, M., Ekladios, I., Colby, A. H., Colson, Y. L., Porter, T. M., & Grinstaff, M. W. (2015). Synthesis and characterization of hybrid polymer/lipid expansile nanoparticles: imparting surface functionality for targeting and stability. *Biomacromolecules*, 16(7), 1958-1966.

[14] Häuser, M., Langer, K., & Schönhoff, M. (2015). pH-Triggered release from surface-modified poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6(1), 2504-2512.

[15] Häuser, M., Langer, K., & Schönhoff, M. (2015). pH-Triggered release from surface-modified poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6(1), 2504-2512.

[16] Su H, Hurd Price CA, Jing L, Tian Q, Liu J, Qian K. Janus particles: design, preparation, and biomedical applications. *Mater Today Bio*. 2019 Oct 21;4:100033. doi: 10.1016/j.mtbio.2019.100033. PMID: 32159157; PMCID: PMC7061647.

- [17] Li, W., Dong, H., Tang, G., Ma, T., & Cao, X. (2015). Controllable microfluidic fabrication of Janus and microcapsule particles for drug delivery applications. *Rsc Advances*, 5(30), 23181-23188.
- [18] Li, B., Shao, W., Wang, Y., Xiao, D., Xiong, Y., Ye, H., ... & Jin, Q. (2019). Synthesis and morphological control of biocompatible fluorescent/magnetic Janus nanoparticles based on the self-assembly of fluorescent polyurethane and Fe₃O₄ nanoparticles. *Polymers*, 11(2), 272.
- [19] Lin SY, Yao BY, Hu CJ, Chen HW. Induction of Robust Immune Responses by CpG-ODN-Loaded Hollow Polymeric Nanoparticles for Antiviral and Vaccine Applications in Chickens. *Int J Nanomedicine*. 2020 May 11;15:3303-3318. doi: 10.2147/IJN.S241492. PMID: 32494131; PMCID: PMC7227821.
- [20] Allahyari M, Mohit E. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. *Hum Vaccin Immunother*. 2016 Mar 3;12(3):806-28. doi: 10.1080/21645515.2015.1102804. PMID: 26513024; PMCID: PMC4964737.
- [21] Haycock CP, Balsamo JA, Glass EB, Williams CH, Hong CC, Major AS, Giorgio TD. PEGylated PLGA Nanoparticle Delivery of Eggmanone for T Cell Modulation: Applications in Rheumatic Autoimmunity. *Int J Nanomedicine*. 2020 Feb 19;15:1215-1228. doi: 10.2147/IJN.S234850. PMID: 32110018; PMCID: PMC7036983.
- [22] Cappellano G, Comi C, Chiochetti A, Dianzani U. Exploiting PLGA-Based Biocompatible Nanoparticles for Next-Generation Tolerogenic Vaccines against Autoimmune Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 8;20(1):204. doi: 10.3390/ijms20010204. PMID: 30626016; PMCID: PMC6337481.
- [23] Pearson RM, Podojil JR, Shea LD, King NJC, Miller SD, Getts DR. Overcoming challenges in treating autoimmunity: Development of tolerogenic immune-modifying nanoparticles. *Nanomedicine*. 2019 Jun;18:282-291. doi: 10.1016/j.nano.2018.10.001. Epub 2018 Oct 21. PMID: 30352312; PMCID: PMC6830541.
- [24] Silva AL, Soema PC, Slütter B, Ossendorp F, Jiskoot W. PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother*. 2016 Apr 2;12(4):1056-69. doi:

10.1080/21645515.2015.1117714. Epub 2016 Jan 11. PMID: 26752261; PMCID: PMC4962933.

[25] Gu P, Wusiman A, Zhang Y, Liu Z, Bo R, Hu Y, Liu J, Wang D. Rational Design of PLGA Nanoparticle Vaccine Delivery Systems To Improve Immune Responses. *Mol Pharm.* 2019 Dec 2;16(12):5000-5012. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00860. Epub 2019 Oct 25. PMID: 31621331.

[26] Gu P, Liu Z, Sun Y, Ou N, Hu Y, Liu J, Wu Y, Wang D. Angelica sinensis polysaccharide encapsulated into PLGA nanoparticles as a vaccine delivery and adjuvant system for ovalbumin to promote immune responses. *Int J Pharm.* 2019 Jan 10;554:72-80. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.008. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30399435.

[27] Zhang, W., Wang, L., Yang, T. *et al.* Immunopotentiator-Loaded Polymeric Microparticles as Robust Adjuvant to Improve Vaccine Efficacy. *Pharm Res* **32**, 2837–2850 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11095-015-1666-6>

[28] Liu Q, Chen X, Jia J, Zhang W, Yang T, Wang L, Ma G. pH-Responsive Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles with Rapid Antigen Release Behavior Promote Immune Response. *ACS Nano.* 2015 May 26;9(5):4925-38. doi: 10.1021/nn5066793. Epub 2015 Apr 24. PMID: 25898266.

[29] Liu L, Ma P, Wang H, Zhang C, Sun H, Wang C, Song C, Leng X, Kong D, Ma G. Immune responses to vaccines delivered by encapsulation into and/or adsorption onto cationic lipid-PLGA hybrid nanoparticles. *J Control Release.* 2016 Mar 10;225:230-9. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.050. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26826307.

[30] Silva AL, Rosalia RA, Varypataki E, Sibuea S, Ossendorp F, Jiskoot W. Poly-(lactic-co-glycolic-acid)-based particulate vaccines: particle uptake by dendritic cells is a key parameter for immune activation. *Vaccine.* 2015 Feb 11;33(7):847-54. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.12.059. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25576216.

[31] Bruno C, Waeckerle-Men Y, Håkerud M, Kündig TM, Gander B, Johansen P. Photosensitizer and Light Pave the Way for Cytosolic Targeting and Generation of Cytosolic CD8 T Cells Using PLGA Vaccine Particles. *J Immunol.* 2015 Jul 1;195(1):166-73. doi: 10.4049/jimmunol.1500431. Epub 2015 May 27. PMID: 26019274.

- [32] Koerner J, Horvath D, Groettrup M. Harnessing Dendritic Cells for Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Microspheres (PLGA MS)-Mediated Anti-tumor Therapy. *Front Immunol.* 2019 Apr 5;10:707. doi: 10.3389/fimmu.2019.00707. PMID: 31024545; PMCID: PMC6460768.
- [33] Shen X, Li T, Xie X, Feng Y, Chen Z, Yang H, Wu C, Deng S, Liu Y. PLGA-Based Drug Delivery Systems for Remotely Triggered Cancer Therapeutic and Diagnostic Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 May 5;8:381. doi: 10.3389/fbioe.2020.00381. PMID: 32432092; PMCID: PMC7214837.
- [34] Madani F, Esnaashari SS, Bergonzi MC, Webster TJ, Younes HM, Khosravani M, Adabi M. Paclitaxel/methotrexate co-loaded PLGA nanoparticles in glioblastoma treatment: Formulation development and in vitro antitumor activity evaluation. *Life Sci.* 2020 Sep 1;256:117943. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117943. Epub 2020 Jun 10. PMID: 32531377.
- [35] Rezvantalab S, Drude NI, Moraveji MK, Güvener N, Koons EK, Shi Y, Lammers T, Kiessling F. PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment. *Front Pharmacol.* 2018 Nov 2;9:1260. doi: 10.3389/fphar.2018.01260. PMID: 30450050; PMCID: PMC6224484.
- [36] Rafiei P, Haddadi A. Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile. *Int J Nanomedicine.* 2017 Jan 27;12:935-947. doi: 10.2147/IJN.S121881. PMID: 28184163; PMCID: PMC5291330.
- [37] Nel A, Ruoslahti E, Meng H. New Insights into "Permeability" as in the Enhanced Permeability and Retention Effect of Cancer Nanotherapeutics. *ACS Nano.* 2017 Oct 24;11(10):9567-9569. doi: 10.1021/acsnano.7b07214. PMID: 29065443.
- [38] Zhu, Y., Feijen, J., & Zhong, Z. (2018). Dual-targeted nanomedicines for enhanced tumor treatment. *Nano Today*, 18, 65-85.
- [39] Al-Jamal KT, Bai J, Wang JT, Protti A, Southern P, Bogart L, Heidari H, Li X, Cakebread A, Asker D, Al-Jamal WT, Shah A, Bals S, Sosabowski J, Pankhurst QA. Magnetic Drug Targeting: Preclinical in Vivo Studies, Mathematical Modeling, and Extrapolation to Humans. *Nano Lett.* 2016 Sep 14;16(9):5652-60. doi: 10.1021/acs.nanolett.6b02261. Epub 2016 Aug 19. PMID: 27541372.

- [40] Cui Y, Zhang M, Zeng F, Jin H, Xu Q, Huang Y. Dual-Targeting Magnetic PLGA Nanoparticles for Codelivery of Paclitaxel and Curcumin for Brain Tumor Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Nov 30;8(47):32159-32169. doi: 10.1021/acsami.6b10175. Epub 2016 Nov 15. PMID: 27808492.
- [41] Dong Z, Gong H, Gao M, Zhu W, Sun X, Feng L, Fu T, Li Y, Liu Z. Polydopamine Nanoparticles as a Versatile Molecular Loading Platform to Enable Imaging-guided Cancer Combination Therapy. *Theranostics*. 2016 Apr 28;6(7):1031-42. doi: 10.7150/thno.14431. PMID: 27217836; PMCID: PMC4876627.
- [42] Yan F, Duan W, Li Y, Wu H, Zhou Y, Pan M, Liu H, Liu X, Zheng H. NIR-Laser-Controlled Drug Release from DOX/IR-780-Loaded Temperature-Sensitive-Liposomes for Chemo-Photothermal Synergistic Tumor Therapy. *Theranostics*. 2016 Oct 1;6(13):2337-2351. doi: 10.7150/thno.14937. PMID: 27877239; PMCID: PMC5118599.
- [43] Wang Z, Li S, Zhang M, Ma Y, Liu Y, Gao W, Zhang J, Gu Y. Laser-Triggered Small Interfering RNA Releasing Gold Nanoshells against Heat Shock Protein for Sensitized Photothermal Therapy. *Adv Sci (Weinh)*. 2016 Oct 19;4(2):1600327. doi: 10.1002/advs.201600327. PMID: 28251053; PMCID: PMC5323853.
- [44] Zhang, K., Li, P., Chen, H., Bo, X., Li, X., & Xu, H. (2016). Continuous cavitation designed for enhancing radiofrequency ablation via a special radiofrequency solidoid vaporization process. *Acs Nano*, 10(2), 2549-2558.
- [45] Xiao B, Ma L, Merlin D. Nanoparticle-mediated co-delivery of chemotherapeutic agent and siRNA for combination cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv*. 2017 Jan;14(1):65-73. doi: 10.1080/17425247.2016.1205583. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27337289; PMCID: PMC5531052.
- [46] Wang K, Kievit FM, Zhang M. Nanoparticles for cancer gene therapy: Recent advances, challenges, and strategies. *Pharmacol Res*. 2016 Dec;114:56-66. doi: 10.1016/j.phrs.2016.10.016. Epub 2016 Oct 19. PMID: 27771464.
- [47] Liu Y, Zhao G, Xu CF, Luo YL, Lu ZD, Wang J. Systemic delivery of CRISPR/Cas9 with PEG-PLGA nanoparticles for chronic myeloid leukemia targeted therapy. *Biomater Sci*. 2018 May 29;6(6):1592-1603. doi: 10.1039/c8bm00263k. PMID: 29725684.

- [48] Yoon HY, Selvan ST, Yang Y, Kim MJ, Yi DK, Kwon IC, Kim K. Engineering nanoparticle strategies for effective cancer immunotherapy. *Biomaterials*. 2018 Sep;178:597-607. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.036. Epub 2018 Mar 21. PMID: 29576282.
- [49] Li J, Lin W, Chen H, Xu Z, Ye Y, Chen M. Dual-target IL-12-containing nanoparticles enhance T cell functions for cancer immunotherapy. *Cell Immunol*. 2020 Mar;349:104042. doi: 10.1016/j.cellimm.2020.104042. Epub 2020 Jan 27. PMID: 32061376.
- [50] Da Silva CG, Camps MGM, Li TMWY, Chan AB, Ossendorp F, Cruz LJ. Co-delivery of immunomodulators in biodegradable nanoparticles improves therapeutic efficacy of cancer vaccines. *Biomaterials*. 2019 Nov;220:119417. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119417. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31419588.
- [51] Ahmed KK, Geary SM, Salem AK. Development and Evaluation of Biodegradable Particles Coloaded With Antigen and the Toll-Like Receptor Agonist, Pentaerythritol Lipid A, as a Cancer Vaccine. *J Pharm Sci*. 2016 Mar;105(3):1173-9. doi: 10.1016/j.xphs.2015.11.042. Epub 2016 Jan 30. PMID: 26886334; PMCID: PMC4775392.
- [52] Chen Q, Bao Y, Burner D, Kaushal S, Zhang Y, Mendoza T, Bouvet M, Ozkan C, Minev B, Ma W. Tumor growth inhibition by mSTEAP peptide nanovaccine inducing augmented CD8⁺ T cell immune responses. *Drug Deliv Transl Res*. 2019 Dec;9(6):1095-1105. doi: 10.1007/s13346-019-00652-z. PMID: 31228097.
- [53] Bae J, Parayath N, Ma W, Amiji M, Munshi N, Anderson KC. BCMA peptide-engineered nanoparticles enhance induction and function of antigen-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes against multiple myeloma: clinical applications. *Leukemia*. 2020 Jan;34(1):210-223. doi: 10.1038/s41375-019-0540-7. Epub 2019 Aug 19. Erratum in: *Leukemia*. 2020 Jan 16; PMID: 31427721; PMCID: PMC7297141.
- [54] Cruz LJ, Tacke PJ, van der Schoot JMS, Rueda F, Torensma R, Figdor CG. ICAM3-Fc Outperforms Receptor-Specific Antibodies Targeted Nanoparticles to Dendritic Cells for Cross-Presentation. *Molecules*. 2019 May 12;24(9):1825. doi: 10.3390/molecules24091825. PMID: 31083610; PMCID: PMC6540027.

- [55] Song, L., Zhao, N., & Xu, F. J. (2017). Hydroxyl-Rich Polycation Brushed Multifunctional Rare-Earth-Gold Core–Shell Nanorods for Versatile Therapy Platforms. *Advanced Functional Materials*, 27(32), 1701255.
- [56] Yang H , Shen X , Yan J , Xie X , Chen Z , Li T , Li S , Qin X , Wu C , Liu Y . Charge-reversal-functionalized PLGA nanobubbles as theranostic agents for ultrasonic-imaging-guided combination therapy. *Biomater Sci*. 2018 Aug 21;6(9):2426-2439. doi: 10.1039/c8bm00419f. PMID: 30040100.
- [57] Abe GL, Sasaki JI, Katata C, Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S. Fabrication of novel poly(lactic acid/caprolactone) bilayer membrane for GBR application. *Dent Mater*. 2020 May;36(5):626-634. doi: 10.1016/j.dental.2020.03.013. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32224061.
- [58] Ortega-Oller I, Padial-Molina M, Galindo-Moreno P, O'Valle F, Jódar-Reyes AB, Peula-García JM. Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles. *Biomed Res Int*. 2015;2015:415289. doi: 10.1155/2015/415289. Epub 2015 Oct 5. PMID: 26509156; PMCID: PMC4609778.
- [59] Geskovski N, Sazdovska SD, Gjosheva S, Petkovska R, Popovska M, Anastasova L, Mladenovska K, Goracinova K. Rational development of nanomedicines for molecular targeting in periodontal disease. *Arch Oral Biol*. 2018 Sep;93:31-46. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.05.009. Epub 2018 May 14. PMID: 29803992.
- [60] Cai Q, Wang L, Deng G, Liu J, Chen Q, Chen Z. Systemic delivery to central nervous system by engineered PLGA nanoparticles. *Am J Transl Res*. 2016 Feb 15;8(2):749-64. PMID: 27158367; PMCID: PMC4846924.
- [61] Liu J, Li S, Li G, Li X, Yu C, Fu Z, Li X, Teng L, Li Y, Sun F. Highly bioactive, bevacizumab-loaded, sustained-release PLGA/PCADK microspheres for intravitreal therapy in ocular diseases. *Int J Pharm*. 2019 May 30;563:228-236. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.012. Epub 2019 Apr 5. PMID: 30959236.
- [62] Hu Y, Li M, Zhang M, Jin Y. Inhalation treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with curcumin large porous microparticles. *Int J Pharm*. 2018 Nov 15;551(1-2):212-222. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.031. Epub 2018 Sep 15. PMID: 30227240.

- [63] Halder A, Shukla D, Das S, Roy P, Mukherjee A, Saha B. Lactoferrin-modified Betulinic Acid-loaded PLGA nanoparticles are strong anti-leishmanials. *Cytokine*. 2018 Oct;110:412-415. doi: 10.1016/j.cyto.2018.05.010. Epub 2018 May 18. PMID: 29784509.
- [64] Huang Y, Guo J, Gui S. Orally targeted galactosylated chitosan poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with TNF- α siRNA provide a novel strategy for the experimental treatment of ulcerative colitis. *Eur J Pharm Sci*. 2018 Dec 1;125:232-243. doi: 10.1016/j.ejps.2018.10.009. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30315858.
- [65] Turek A, Stoklosa K, Borecka A, Paul-Samojedny M, Kaczmarczyk B, Marcinkowski A, Kasperczyk J. Designing Biodegradable Wafers Based on Poly(L-lactide-co-glycolide) and Poly(glycolide-co- ϵ -caprolactone) for the Prolonged and Local Release of Idarubicin for the Therapy of Glioblastoma Multiforme. *Pharm Res*. 2020 May 7;37(5):90. doi: 10.1007/s11095-020-02810-2. PMID: 32382838; PMCID: PMC7205781.
- [66] Lovastatina -> Langert KA, Goshu B, Stubbs EB Jr. Attenuation of experimental autoimmune neuritis with locally administered lovastatin-encapsulating poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles. *J Neurochem*. 2017 Jan;140(2):334-346. doi: 10.1111/jnc.13892. Epub 2016 Dec 20. PMID: 27861905; PMCID: PMC5225029
- [67] Casey LM, Pearson RM, Hughes KR, Liu JMH, Rose JA, North MG, Wang LZ, Lei M, Miller SD, Shea LD. Conjugation of Transforming Growth Factor Beta to Antigen-Loaded Poly(lactide- co-glycolide) Nanoparticles Enhances Efficiency of Antigen-Specific Tolerance. *Bioconj Chem*. 2018 Mar 21;29(3):813-823. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00624. Epub 2017 Nov 30. PMID: 29148731; PMCID: PMC6850215.
- [68] Zhao J, Zhao M, Yu C, Zhang X, Liu J, Cheng X, Lee RJ, Sun F, Teng L, Li Y. Multifunctional folate receptor-targeting and pH-responsive nanocarriers loaded with methotrexate for treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Nanomedicine*. 2017 Sep 11;12:6735-6746. doi: 10.2147/IJN.S140992. PMID: 28932117; PMCID: PMC5600269.

- [69] Yu C, Zhang X, Sun X, Long C, Sun F, Liu J, Li X, Lee RJ, Liu N, Li Y, Teng L. Ketoprofen and MicroRNA-124 Co-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres inhibit progression of Adjuvant-induced arthritis in rats. *Int J Pharm.* 2018 Dec 1;552(1-2):148-153. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.063. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30268854.
- [70] Yoon YM, Lewis JS, Carstens MR, Campbell-Thompson M, Wasserfall CH, Atkinson MA, Keselowsky BG. A combination hydrogel microparticle-based vaccine prevents type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Sci Rep.* 2015 Aug 17;5:13155. doi: 10.1038/srep13155. PMID: 26279095; PMCID: PMC4538389.
- [71] Lewis JS, Dolgova NV, Zhang Y, Xia CQ, Wasserfall CH, Atkinson MA, Clare-Salzler MJ, Keselowsky BG. A combination dual-sized microparticle system modulates dendritic cells and prevents type 1 diabetes in prediabetic NOD mice. *Clin Immunol.* 2015 Sep;160(1):90-102. doi: 10.1016/j.clim.2015.03.023. Epub 2015 Apr 2. PMID: 25842187; PMCID: PMC4554803
- [72] Meng, Q., Wang, A., Hua, H., Jiang, Y., Wang, Y., Mu, H., ... & Sun, K. (2018). Intranasal delivery of Huperzine A to the brain using lactoferrin-conjugated N-trimethylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for treatment of Alzheimer's disease. *International journal of nanomedicine*, 13, 705.
- [73] Mansor, M. H., Najberg, M., Contini, A., Alvarez-Lorenzo, C., Garcion, E., Jérôme, C., & Boury, F. (2018). Development of a non-toxic and non-denaturing formulation process for encapsulation of SDF-1 α into PLGA/PEG-PLGA nanoparticles to achieve sustained release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 125, 38-50.
- [74] Goudarzi, F., Asadi, A., Afsharpour, M., & Jamadi, R. H. (2018). In vitro characterization and evaluation of the cytotoxicity effects of nisin and nisin-loaded PLA-PEG-PLA nanoparticles on gastrointestinal (AGS and KYSE-30), hepatic (HepG2) and blood (K562) cancer cell lines. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), 1554-1566.
- [75] Yasar, H., Biehl, A., De Rossi, C., Koch, M., Murgia, X., Loretz, B., & Lehr, C. M. (2018). Kinetics of mRNA delivery and protein translation in dendritic cells using lipid-coated PLGA nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 72.

- [76] Wong, J. K., Mohseni, R., Hamidieh, A. A., MacLaren, R. E., Habib, N., & Seifalian, A. M. (2017). Will nanotechnology bring new hope for gene delivery?. *Trends in biotechnology*, 35(5), 434-451.
- [77] Xiao, Y., Shi, K., Qu, Y., Chu, B., & Qian, Z. (2019). Engineering nanoparticles for targeted delivery of nucleic acid therapeutics in tumor. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 12, 1-18.
- [78] Sun, Y., Jensen, H., Petersen, N. J., Larsen, S. W., & Østergaard, J. (2017). Phase separation of in situ forming poly (lactide-co-glycolide acid) implants investigated using a hydrogel-based subcutaneous tissue surrogate and UV–vis imaging. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 145, 682-691.
- [79] Lizambard M, Menu T, Fossart M, Bassand C, Agossa K, Huck O, Neut C, Siepmann F. In-situ forming implants for the treatment of periodontal diseases: Simultaneous controlled release of an antiseptic and an anti-inflammatory drug. *Int J Pharm.* 2019 Dec 15;572:118833. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118833. Epub 2019 Nov 9. PMID: 31715363.
- [80] Luo L, Yang J, Oh Y, Hartsock MJ, Xia S, Kim YC, Ding Z, Meng T, Eberhart CG, Ensign LM, Thorne JE, Stark WJ, Duh EJ, Xu Q, Hanes J. Controlled release of corticosteroid with biodegradable nanoparticles for treating experimental autoimmune uveitis. *J Control Release.* 2019 Feb 28;296:68-80. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.01.018. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30660629; PMCID: PMC6476551