

Липидните наночастици – преносители на лекарства и ваксини

Румяна Койнова, Борис Тенчов

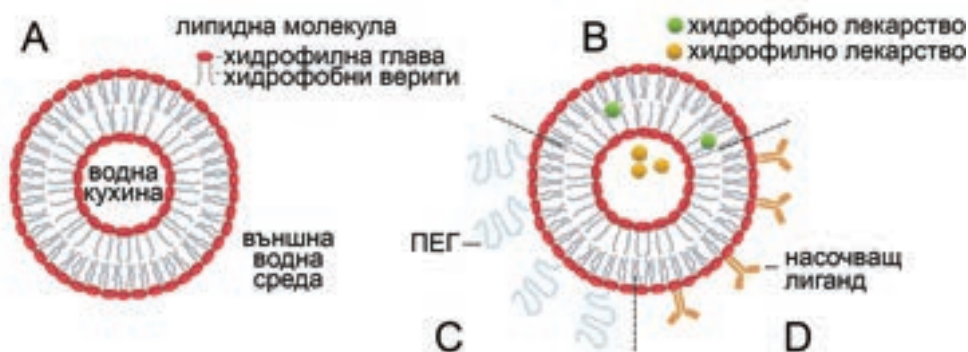
ЛНЧ имат приложения и в редица области, като образна диагностика, козметика, хранене, селско стопанство, както и в някои иновативни направления – например разработката на нанореактори. Днес в светлината на прожекторите е приложението им като критично важен компонент на новите РНК ваксини срещу COVID-19, където ЛНЧ изграят ключова роля за защита и ефективно транспортиране на информационната РНК до клетките.

Липозоми – първо поколение липидни наночастици. Терминът „липозома“ е въведен през 60-те години на миналия

Липидните наночастици (ЛНЧ) се появиха в медицината като обещаващо ново средство за пренос в организма на разнообразни терапевтични агенти, както малки лекарствени молекули, така също нуклеинови киселини и протеини. Със способността си да капсулират и пренасят лекарства до определени места в организма и да освобождават съдържанието си в желаното време, ЛНЧ представляват ценна платформа за лечение на широк кръг заболявания.

век, малко след като бе установено, че липидни бислойни везикули (мехурчета) могат да се образуват спонтанно във водна среда. Тъй като липозомите се състоят от липидни молекули и, особено тези за терапевтично приложение, имат размери в

нанодиапазона (пог 1 микрометър), те с основание се считат за първо поколение липидни наночастици. Потенциалът на липозомите като система за пренос на лекарства е оценен почти веднага след откриването им. Всъщност липозомите са първата платформа в областта на наномедицината, която успешно е преминала всички етапи – от концепция до клинични приложения – и е довела до



Схематично представяне на: (А) липозома; (В) липозома, капсулираща хидрофобно и хидрофилно лекарства; (С) «невидима» (stealth) липозома, стерично стабилизирана с инертни полимери като ПЕГ, които я правят трудно откриваема за фагоцитите; (D) липозома, функционализирана с насочващи лиганди (targeting)

ред нови лечебни препарати. Първото липозомно лекарство е Doxil, одобрено през 1995 г., което включва антитуморния агент доксорубицин и се използва за лечение на рак на яйчниците. Друго липозомно лекарство (Eprex) включва протеинов антиген в липозоми и се прилага като ваксина срещу хепатит. Липозомите са обект на многобройни клинични изследвания като система за пренос на противоракови, противовъзпалителни, антибиотични, противовъзбични и анестетични лекарства, както и за генна терапия. В резултат, ред липозомни препарати са одобрени за употреба като лекарства и ваксини (Таблица 1).

Основни липозомни съставки са най-разпространените природни фосфолипиди като фосфатидилхолин, фосфатидилетаноламин, фосфатидилсерин и фосфатидилглицерол, както и пластификатора холестерол.

Липозомите се състоят от един или няколко липидни бислоя и обикновено имат размери в диапазона от 20 до 1000 нм. Хидрофилните лекарства могат да

бъдат капсулирани в техния вътрешен воден обем, докато хидрофобните лекарства могат да бъдат включени в областта на въглеродородните вериги на липидния бислой. Това прави липозомите универсална платформа за доставка както на водоразтворими, така и на водонеразтворими лекарства. Структурата на липозомите зависи от начина на тяхното приготвяне. Има няколко основни вида липозоми – малки еднослойни везикули (SUV) с диаметър 20 – 100 нм, големи еднослойни везикули (LUV) с диаметър 100 – 1000 нм, гигантски еднослойни везикули (GUV) с диаметри над 1000 нм и многослойни везикули (MLV), с диаметри около 500 нм, в които концентричните бислоеве образуват многослойна структура, подобна на лукова глава. Като системи за доставка на лекарства се използват SUV, LUV и MLV.

Функционални модификации на липозомите. Въпреки своите достоинства, немодифицираните липозомни системи за пренос на лекарства имат значител-

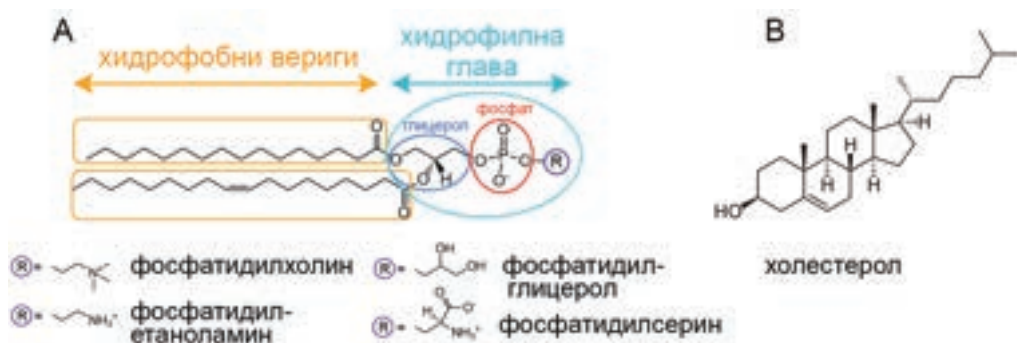
Таблица 1. Одобрени лекарства на база-та на липидни наночастици

Предназначение	Лекарство
противотуморни	Marqibo
	Vyxeos
	Dauno-Xome
	Visudyne
	Myocet
	Onivyde
	ThermoDox
	Mepact
	Depocyt
	Caelyx
	Doxil
	Lipusu
фунгициди	Abelcet
	Ambisome
	Amphotec
	Fungizone
аналгетици	DepoDur
	Exparel
	Diprivan
хормонални	Estrasorb
имуносупресанти	Rapamune
	Ikervis
респираторни	Curosurf
антихемофилични	Advate
вирусни ваксини	Epaxal
	Inflexal V
РНК лекарства	Onpattro
иРНК ваксини	BNT162b2
	mRNA-1273

ни ограничения като кратко време на циркулация в кръвообращението, нестабилност *in vivo* и липса на селективност. Във връзка с това са разработени различни модификации на липозомните препарати, които са предназначени да преодолеят тези недостатъци.

За насочване (targeting) на липозомите към определени клетки и тъкани към тях се прикрепят лиганди (молекули, образуващи комплекси с други молекули), които разпознават и се свързват със специфични рецептори на повърхността на клетките. По такъв начин, чрез конюгиране (свързване) на малки молекули, пептиди или моноклонални антитела към липозомната повърхност, се намаляват неспецифичните взаимодействия на липозомите с клетките и се увеличава тяхната ефективност. Например, ефективността на липозоми, модифицирани с IgM лиганд, е около 100 пъти по-висока от тази на немодифицираните липозоми. Някои рецептори, като фолатният рецептор, трансфериновият рецептор и рецепторът на епидермалния растежен фактор (EGFR), са свръхекспресирани в много видове ракови клетки и се използват за насочване на липозомите към туморните тъкани.

Въпреки че модифицираните с антитела липозоми са високо селективни към определени видове клетки, фагоцитите бързо ги откриват и отстраняват от кръвния поток. За да се реши този проблем, липозомите се покриват с биосъвместими инертни полимери, което ги прави трудно откриваеми за имунната система. Това са така наречените „невидими“ (stealth) липозоми. Например, полиетиленгликолят (PEG) създава пространствени препятствия, които силно ограничават достъпа на фагоцитите до липозомната повърхност. Това позволява да се получават стабилизирани



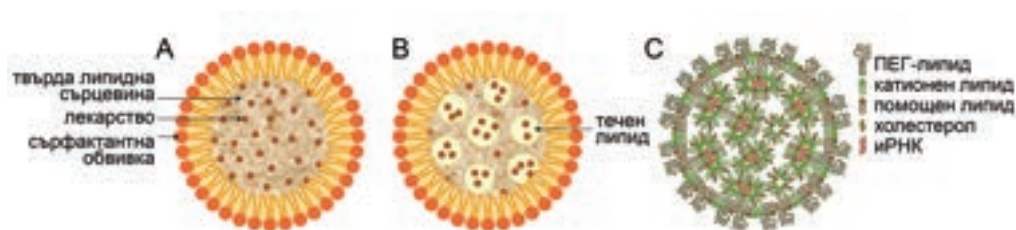
Липидни компоненти на липозомите. (А) Структура на фосфолипидната молекула; показани под нея са химическите структури на полярните групи R, по които основните класове фосфолипиди се различават; (В) Структура на холестерола

липозоми с увеличени времена на циркулация в кръвта, зависещи от дължината и плътността на PEG веригите на тяхната повърхност.

Рег липозомни препарати са проектирани да освобождават капсулираните в тях лекарства, когато са изложени на определени физически и химически стимули. Тези стимули предизвикват образуване на дефекти (пори) в липозомните мембрани, през които лекарството изтича в околната среда. Тази възможност за контролирано повишаване на проникваемостта на липозомите посредством специфични въздействия с последващо освобождаване на лекарствата, включени в тях, повишава ефективността на тези лекарства и намалява неблагоприятните им странични ефекти. Разработени са липозомни препарати, реагиращи на температура, промени в рН, ензими, светлина, магнитни и електрически полета и ултразвук. Промяната на рН е обещаващ стимул поради съществуването на множество градиенти на рН в тялото. Системите, реагиращи на температура, са проучени подробно във връзка с преноса на противоракови лекарства. Когато са

изложени на слабо локално нагряване (~ 40 – 41°C), част от липидите се доближават до своята температура на фазов преход на топене, който създава дефекти между техните твърди и течни домени и така прави мембраните пропускливи за водоразтворимите молекули. Това може да доведе до лавинообразно освобождаване на пренасяното лекарство в тумора.

Твърди липидни наночастици (ТЛН) и наноструктурирани липидни носители (НЛН). Липозомите са полезни наноносители на лекарства, но те изискват сложни технологични методи за приготвяне с използване на органични разтворители, имат относително ниска ефективност на включване на лекарствата и са трудни за получаване в големи количества. Твърдите липидни наночастици (ТЛН) и наноструктурираните липидни носители (НЛН) са разработени през 1994 – 95 г. за отстраняване на тези недостатъци. ТЛН и НЛН се състоят от липиди и примеси от стабилизиращи агенти, например, повърхностно активни вещества (ПАВ). ПАВ са разположени на границата между липидите и вода-



Схематично представяне на: (А) твърда липидна наночастица (ТЛН), (В) наноструктуриран липиден носител (НЛН) и (С) катионна липидна наночастица, включваща РНК ваксина и организирана в обратни липидни мицели

та, те намаляват междофазовото напрежение между липидната и водната фази и подобряват стабилността на дисперсиите от наночастици. Докато конвенционалните липозоми съдържат течнокристални липидни бислоеве, ТЛН съдържат липиди в твърда фаза, а НЛН съдържат смеси от твърди и течнокристални липиди. Поради това ТЛН и НЛН проявяват повишена физическа стабилност във времето, което елиминира едно от основните ограничения на емулсионните препарати. ТЛН и НЛН имат също по-висок капацитет за включване на лекарства и се произвеждат лесно в големи количества, без да се използват органични разтворители. В допълнение, намалената подвижност на молекулите в твърда фаза позволява да се контролира по-прецизно освобождаването на лекарствата от ТЛН и от НЛН.

Комплекси на катионни липиди с нуклеинови киселини (липоплекси). Напредъкът в изясняването на механизмите на клетъчната патогенеза (увреждания на клетките) направи възможно терапевтичното третиране на множество гени, участващи в човешките заболявания. Нуклеиновите киселини имат многобройни приложения в това отношение, но развитието на терапиите с

нуклеинови киселини се възпрепятства от трудностите при тяхното въвеждане в клетките. Отрицателните заряди и хидрофилността на нуклеиновите киселини възпрепятстват пасивната им дифузия през плазмените мембрани. В допълнение, свързването на нуклеиновите киселини със серумните протеини, тяхното отстраняване от фагоцитите и разграждане от ендогенните нуклеази също препятстват ефективно им въвеждане. В резултат от това нуклеиновите киселини се нуждаят от вектори носители, които да ги предпазват от разграждане и да ги доставят неувредени до клетките. За тази цел се разработват както вирусни, така и невирусни вектори. След синтезата на първия катионен липид през 1987 г., комплексите между синтетични катионни липиди и анионни нуклеинови киселини, т.н. липоплекси, се превърнаха в най-широко използваната невирусна система за доставяне на лекарства на основата на нуклеинова киселина.

Комплексирането с положително заредени катионни липиди стабилизира нуклеиновите киселини и повишава тяхната устойчивост спрямо разграждане от нуклеазите, което позволява да бъдат доставяни невредими до желаната цел. Нуклеиновите киселини навлизат в клет-



Проф. д-р Румяна Койнова и академик Борис Тенчов са работили съвместно в Института по биофизика на БАН. Акад. Тенчов е работил също в Медицински университет – София и е бил ръководител на катедра Медицинска физика и биофизика. Значителна част от техните научни изследвания са посветени на свойствата на липидните наночастици и на приложенията им като преносители на нуклеинови киселини.

ките чрез адсорбция на ЛНЧ към клетъчната повърхност, последвана от тяхната ендоцитоза и освобождаване на нуклеиновите киселини вътре в клетката. Адсорбцията на ЛНЧ се благоприятства електростатично, тъй като клетъчните мембрани като правило имат отрицателен електрически заряд, докато наночастиците от катионни липиди за доставяне на нуклеинови киселини имат

положителен заряд. Тяхното електростатично привличане води до мембранно сливане и ендоцитоза. След навлизането на ЛНЧ в клетките, нуклеиновите киселини трябва да бъдат освободени от техните комплекси с катионните липиди. Анионните липиди на клетката вероятно помагат за освобождаването им от ЛНЧ, като неутрализират заряда на катионните липидни носители, отслабвайки електростатичните им взаимодействия с нуклеиновите киселини.

Приложение на ЛНЧ за доставка на лекарства.

Едно от най-важните приложения на ЛНЧ е за лечение на рака. Липидните наночастици намаляват цитотоксичността на противораковите лекарства спрямо нормалните тъкани, осигуряват транспорта на хидрофобните лекарства във водна среда и подобряват контрола върху освобождаването на лекарството. ЛНЧ също повишават ефективността на противораковите терапии посредством т.н. „ефект на пропускливост и задържане“ (EPR). Когато се прилагат интравенозно, ЛНЧ се натрупват селективно в туморните тъкани, тъй като кръвоносните съдове в тези тъкани са по-пропускливи и тези тъкани имат по-големи междуклетъчни пространства (с размери над 100 nm), които са резултат от тяхната бърза, но дефектна ангиогенеза (изграждане на кръвоносни съдове). В допълнение, слабо развитата им лимфна система улеснява задържането на ЛНЧ. Комбинацията от тези два фактора – пропускливост и задържане на наночастиците в туморните тъкани – се нарича EPR ефект. Пасивното натрупване на ЛНЧ в туморите позволява да се достигат значително по-високи концентрации на антитуморни агенти в туморните в сравнение със здравите тъкани.



Механизъм на иРНК-медицирано ваксиниране

Doxil, първият одобрен противораков лекарствен нанопрепарат, както и първото изобщо одобрено липозомно лекарство, е предназначен да подобри фармакокинетиката (движение на лекарствата в живия организъм) и биоразпределението на антрациклиновото лекарство доксорубицин, което е мощен, но също така и кардиотоксичен противораков агент. Doxil съдържа ЛНЧ с размери около 100 нм, които се акумулират в туморите благодарение на EPR ефекта. Тези ЛНЧ са стерично стабилизирани, което удължава времето им на циркулация в кръвообращението. Doxil се прилага интравенозно за лечение на напреднал рак на яйчниците, множествен миелом и СПИН-асоцииран сарком на Kaposi.

Втората по големина група липозомни препарати включва антигъбични препарати (фунгициди). Амфотерицин В е широкоспектърен полиенов антибиотик, който се използва в медицината повече от петдесет години и се счита

за златен стандарт за лечение на инвазивни гъбични инфекции. Амфотерицин В има обаче ниска разтворимост във вода и не е мембранно проникваем, затова изисква ефективен преносител. Досега са разработени няколко вида липидни наночастици, съдържащи амфотерицин В, които имат благоприятни фармакокинетични профили и значително намаляват токсичните странични ефекти на лекарството.

Терапевтичните средства, основани на нуклеинови киселини, са нов клас лекарства, които имат значителен потенциал за лечение на различни заболявания. Лекарството с нуклеинова киселина Patisiran, което съдържа siRNA, въведена в ЛНЧ за намаляване на образуването на протеина транскриптин в черния дроб, наскоро получи одобрение за лечение на наследствена транскриптин-медирана амилоидоза и представлява първата лекарствена формулировка на siRNA (малки интерфериращи РНК), базирана на ЛНЧ.

Особено впечатляващо в последно време е успешното приложение на ЛНЧ като носители в двете РНК ваксини, неотдавна разработени от Pfizer/BioNTech и Moderna и прилагани на милиони хора по целия свят срещу COVID-19, които показват забележителна ефективност в превенцията на заболяването. Тези ваксини доставят информационна РНК, кодираща протеина на SARS-CoV-2 в цитоплазмата на клетките гостоприемници. Това предизвиква синтеза на този протеин, който действа като антиген и води до развитие на имунен отговор спрямо вируса. Съставите на липидните наночастици в двете РНК ваксини са много сходни. И двете съдържат йонизиращ се липид, който се зарежда положително при ниско рН, позволяващо комплексване на РНК, и електрически неутрален при физиологично рН, с което се намаляват потенциалните токсични ефекти и се улеснява освобождаването на полезния товар. Тези катионни липиди са третични амини и съдържат разклонени въглеродородни вериги, помагачи за образуването на неламеларни липидни фази, които увеличават ефективността на доставяне на иРНК. ЛНЧ съдържат също ПЕГ липид (PEG-2000 конюгати), който намалява асоциирането на антигеновете към тях (опсонизацията им). По този начин се осигурява по-продължителната им циркулация в кръвното русло. Други важни липидни компоненти на ЛНЧ са фосфолипидът дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) и холестеролът, които способстват за формирането на ЛНЧ и задържането на РНК в тях. Използва се микрофлуидно устройство за смесване на поток, съдържащ РНК във вода, с поток, съдържащ липидна смес в етанол. При бързо смесване на тези два потока се образуват наночастици, които задържат отрицателно заредената

РНК. Тези наночастици са с диаметър 80 – 100 нм и съдържат около 100 РНК молекули на една липидна наночастица.

Приложения на ЛНЧ в козметиката.

Основните предимства на разработваните липозомни козметични състави са повишената им стабилност и успешно проникване в кожата. Вече са достъпни за употреба редица липозомни козметични продукти. Първият липозомен продукт, Capture, се появява през 1986 г. Той съдържа екстракт от тимус, хиалуронова киселина и пептиди от колаген и еластин, включени в липозоми от соев лецитин. Друг липозомен препарат, съдържащ хиалуронова киселина, е комплексът за възстановяване на кожата Advanced Night Repair. Този комплекс неутрализира и отстранява увреждащите, причинени от генерираните от ултравиолетовите лъчи свободни радикали, а също така е и ефективен овлажнител на кожата. Продуктът против бръчки, Revitalift Double Lifting, съдържа про-ретинол А. Концентратът Royal Jelly Lift включва липозоми и сложна смес от аминокиселини, витамини и минерали, която стимулира обновяването на клетките и предотвратява бръчките по кожата. Липозомите също се използват и в много групи козметични кремове и гелове, формулирани с различни екстракти, овлажнители, антибиотици и протеини, с приложения за заздравяване на рани, против стареене на кожата, за облекчаване на слънчево изгаряне, като слънцезащитни продукти и групи.

Екзозоми – природните липидни везикули. Почти 25 години след като учените откриват липозомите, през 1983 г. беше установено, че подобни липидни везикули се образуват и по естествен път в живите организми. Тези везикули,

наречени екзозоми, се освобождават от клетките като част от нормалните им физиологични функции или в резултат от някои патологии. Екзозомите се произвеждат в ендозомното отделение на еукариотните клетки. Те се образуват чрез инвагинация на ендозомната мембрана (огъване с образуване на затворено пространство) и впоследствие се освобождават в извънклетъчното пространство. Размерите им са в диапазона от около 40 до 160 нм (средно около 100 нм в диаметър). Техните функции са все още в голяма степен дискуссионни, но са обект на много голям интерес, тъй като вече е ясно, че те имат фундаментални физиологични функции, а именно, счита се, че екзозомите са основно звено в междуклетъчната комуникация и сигнализация, включително и в транспорта на биомолекули като нуклеинови киселини, протеини и липиди между клетките. Предполага се, че секрецията на екзозомите е свързана с имунния отговор на клетките и затова повечето от наличните данни за екзозомите са получени в изследвания върху имунните клетки. Екзозомите се считат способни да генерират противотуморни имунни отговори, което предизвиква все по-голям интерес към клиничните им приложения.

Перспективи. Нанотехнологиите разкриват нови хоризонти в науката и по-специално в медицината. Поради малките си размери и голямата си повърхност, наночастиците придобиват нови

качества, които водят до значителни промени в свойствата на лекарствени форми, основани на наночастици. В последните години в областта на наномедицината е постигнат огромен напредък в разработката както на нови високочувствителни диагностични методи, така и на ефективни методи за терапия на ред заболявания посредством нови лекарствени препарати, използващи различни видове наночастици. Прилагането на нанотехнологични стратегии значително намалява ограниченията, присъщи на конвенционалните системи и подобрява ефективността, селективността, времето на циркулация и биоразпределението на лекарствени средства.

Приложенията на ЛНЧ в медицината вероятно значително ще нарастнат в близко бъдеще. ЛНЧ ще се използват за разработване на ваксини, в имуноонкологията, за редактиране на гени и при други генетични терапии, разчитащи на способността на ЛНЧ за ефективно доставяне на нуклеинови киселини в клетките. ЛНЧ имат редица предимства пред други системи за транспорт на терапевтични агенти. Те са биосъвместими и биоразградими, имат ниска имуногенност, по-лесни (и по-евтини) са за производство в големи количества и могат да пренасят по-голям полезен товар. Тези техни характеристики дават основания за оптимизъм в очакванията за развитие на нови методи в наномедицината, основани на използването на липидни наночастици. ■

От гигантската речна костенурка вече има само 2 – 3 живи екземпляри в света?



една от малкото женски костенурки от вида *Rafetus swinhoe*, където с нея са правили опити за размножаване и опазване на вида. Тя била обект на специални грижи и на 4 опита за изкуствено оплождане, но без резултат. За целта била използвана сперма от доста възрастен мъжки екземпляр от

същия зоопарк. След петия опит женската внезапно умряла на следния ден, с което пропаднали и усилията за запазването на този вид.

Последните предположения за вероятно съществуване на още 2 живи екземпляра от вида в езерото Донг Мо във Виетнам са на медийната агенция Associated Press от 2020 г. Техният пол обаче е неизвестен и използването им за запазване на този изключително застрашен от изчезване вид е несигурно засега.

С Гигантската речна костенурка са свързани много митове и легенди в Китай и особено във Виетнам, където тя даже е символ на борбите на народа за независимост. В една от тези легенди се разказва, че през XV век една Гигантска речна костенурка изплувала от водите на езерото Хоан-ке и дала на националния герой Ле Лою меч, с който той победил китайските завоеватели и създал виетнамската династия Ле. След приключването на войната и установяването на династията, когато Ле Лою отново плувал в езерото с лодка, огромна речна костенурка отново изскочила от водите, грабнала меч от пояса на владетеля и го скрила в езерото. Според легендата оттогава и езерото е получило името Хоан-ке, което означавало „Езерото на върнатия меч“?

Най-голямата съвременна речна костенурка с право носи името Гигантска речна костенурка. Това е видът *Rafetus swinhoe*, който в миналото е бил изобилен в голямата китайска река Яндзъ и нейните притоци, както и в голямото езеро Хоан ке в Северен Виетнам. Размерите на това странно влечуго наистина са впечатляващи – на дължина мъжките екземпляри достигат до 1.50 м., а теглото му – до 200 кг. Счита се, че продължителността на живота е до 100 години. Друга интересна особеност за този древен обитател на нашата планета е, че той няма твърда външна черупка като съвременните си събратя, а тялото му е обвито само от мека кожата обвивка. През последните десетилетия и особено от средата на миналия век, числеността му е силно редуцирана поради антропогенния натиск и замърсяването на р. Яндзъ и притоците ѝ. Според някои източници последното наблюдение на жив екземпляр в тази река е през 1998 г. Оттогава до около 2010 г. няколко живи екземпляри са останали само в някои китайски зоопаркове и езера във Виетнам. През 2016 г. една от костенурките във Виетнам също умряла и се предполага, че са останали не повече от 2 – 3 екземпляра в тази страна.

През 2019 г. китайски списания съобщиха новината, че в китайски зоопарк е умряла

По Природная механика