

# Nanodelci: sodobni dostavni sistem za učinkovine in antigene celicam imunskega sistema

## Nanoparticles: advanced delivery system for drugs and antigens to the cells of the immune system

Nataša Obermajer, Janko Kos, Julijana Kristl

**Povzetek** Imunske celice se nahajajo v telesnih tekočinah in tkivih po celotnem organizmu in predstavljajo premikajoče tarče za ciljanje z učinkovinami. Zaradi neoptimalnega klasičnega načina dostavljanja učinkovin tem celicam, kjer bi le z visokimi vrednostmi proste učinkovine v serumu dosegli zadovoljive učinke, predstavljajo nanodelci privlačen sistem za dostavo učinkovin imunskim celicam. Nanodelce lahko uporabimo kot dostavne sisteme za bolj učinkovit vnos antigenov v antigen predstavitve celice, kot tudi za dostavo učinkovin določenim populacijam limfocitov. S tem dosežemo regulacijo imunskega delovanja ali pa imunski sistem izkoristimo za povečanje učinkovitosti vgrajenih učinkovin v nanodelce pri zdravljenju okuženih ali tumorskih celic.

**Ključne besede:** nanodelci, ciljanje, protitelesa, celice imunskega sistema

**Abstract** As the immune cells are distributed in bodily fluids and tissues throughout the organism, they represent a moving target for drug delivery. In this case a classical approach applying high doses of the drug is not appropriate and, therefore, the use of nanoparticles represents a good alternative to avoid, or at least decrease its side effects and increase efficacy. Nanoparticles can be used as an efficient delivery system to enhance the uptake of antigens by antigen presenting cells as well as to target specific lymphocyte populations. With such approach we can regulate the immune function or merely exploit the function of immune cells to improve efficacy of drug loaded nanoparticles in treatment of infected or malignant transformed cells.

**Key words:** nanoparticles, targeting, antibodies, immune cells

## 1 Uvod

Imunski sistem je pomemben za prepoznavanje in odstranjevanje mikroorganizmov in tujih snovi iz organizma, torej eksogenih spojin, ki vstopajo iz okolja, kot tudi transformiranih endogenih celic in snovi. Pravilna in učinkovita aktivacija imunskega odziva zagotavlja normalno delovanje organizma.

Antigeni so lahko endogenega ali eksogenega izvora. Endogene antigene predstavljajo večinoma spremenjeni celični proteini, lahko tudi glikoproteini ali druge biološke molekule, pri eksogenih antigenih pa gre za predstavitev fagocitiranega materiala. Znotrajcelični antigenski peptidi, kot deli razgrajenih proteinov vseh metabolno aktivnih celic, se večinoma predstavijo na molekulah pglavitnega kompleksa tkivne skladnosti I. razreda (MHC I, ang. major histocompatibility complex type I). Predstavljeni proteini na MHC I po vezavi na T celične receptorje aktivirajo citotoksični T limfocitni (CD8<sup>+</sup>

limfocitni) imunski odziv. Na ta način organizem odstrani spremenjene celice, kot posledico maligne transformacije ali virusne okužbe. Zunajcelični antigenski peptidi pa nastanejo po vstopu zunajceličnega materiala in se predstavljajo z MHC II le na antigen predstavitvenih celicah (APC). Na ta način se aktivira CD4<sup>+</sup> T celični imunski odziv (T celice pomagalke), ki lahko posreduje tudi imunski odziv s protitelesi oz. humoralni imunski odziv proti tem tujkom. Z izkoriščanjem predstavitve antigena preko endogene ali eksogene poti, lahko vplivamo na učinkovito aktivacijo imunskega odziva.

Za primerno aktivacijo imunskega sistema je potrebna:

- prisotnost zadostne količine antigena APC, zlasti makrofagom in dendritičnim celicam,
- nadzorovana predstavitev antigenskih peptidov tarčnim imunskim celicam (T limfociti CD4<sup>+</sup> in/ali CD8<sup>+</sup>),
- proliferacija efektorskih celic kot so citotoksični limfociti T (CTL) in plazmatke - ohranitev aktiviranega imunskega sistema daljši čas (1).

Boljša predstavitev antigenov, ki bi jo dosegli z učinkovito dostavo antigenov fagocitnim APC, bi omogočila močnejši imunski odziv in s tem učinkovitejše odstranjevanje okuženih in rakavih celic (2). Zaradi sposobnosti makrofagov in dendritičnih celic za privzemanje nanodelcev, so le-ti primerna tarča za ciljano zdravljenje, ki bi povzročila učinkovit imunski odziv.

V primeru prekomernega celičnega ali humoralnega imunskega odziva, ki nastopi pri različnih avtoimunskih obolenjih ter v primeru limfoproliferatornih bolezni, pa so primerna tarča zlasti limfociti. Zaradi specifičnih limfocitnih površinskih molekul lahko dosežemo ciljano dostavo z nanodelci kljub heterogeni porazdelitvi limfocitov v organizmu.

V nadaljevanju bomo predstavili lastnosti nanodelcev kot dostavnih sistemov, načine vgrajevanja klasičnih in proteinskih učinkovin, predstavili izdelavo tarčno-specifičnih nanodelcev ter značilnosti specifičnega ciljanja posameznih populacij imunskih celic z nanodelci.

## 2 Lastnosti nanodelcev

Nanodelci so med številnimi znanimi dostavnimi sistemi nanometrskih velikosti izredno privlačni dostavni sistemi (3). So trdni koloidni delci velikosti 10-1000 nm. Zgrajeni so iz nosilnega ogrodja, v katerih je učinkovina raztopljena ali dispergirana ali na katere je učinkovina adsorbirana ali kovalentno vezana (4). Tovrstni dostavni sistemi se odlikujejo po izvrstni zmogljivosti vgradnje učinkovine in omogočajo kontrolirano sproščanje učinkovine kot tudi zaščito pred razgradnjo (5,6). Po intravenski aplikaciji se nanodelci kopičijo v tkivih mononuklearnega fagocitnega sistema ter tudi v tumorskem tkivu, kar je posledica tako imenovanega EPR (enhanced permeability and retention) učinka, pri katerem se nanodelci zadržujejo v tkivih z žiljem s povečano prepustnostjo (7). Z vgradnjo tarčno-specifičnih ligandov na njihovo površino (aktivno ciljanje) pa dosežemo specifično ciljanje v posamezne celice ali tkiva.

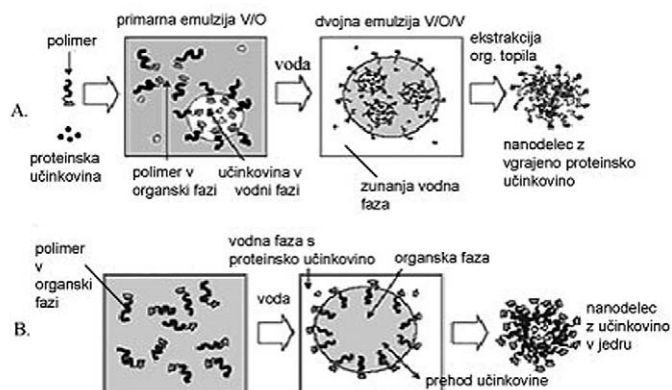
### 2.1 Vgrajevanje učinkovin v nanodelce

Vgradnja učinkovine v ogrodje nanodelcev lahko poteka med samo izdelavo ali pa z adsorbcijo na že formirane nanodelce. Pri prvi metodi lahko pride do kovalentne vezave med učinkovino in polimerom. Pri adsorbciji učinkovine pa je nastala interakcija med adsorbirano učinkovino in nanodelcem lahko nestabilna, zlasti po vnosu pripravka v organizem (4).

Uspešnost vgradnje učinkovine v nanodelce je odvisna od kemične sestave polimera, molekulske mase, interakcij učinkovina-polimer in prisotnosti funkcionalnih skupin (esterskih ali karboksilnih) (4,8). V nanodelce iz hidrofobnih polimerov (PLA - ang. polylactic acid, polimlečna kislina; PLGA - ang. polylactic glycolic acid, poli(mlečna glikolna) kislina) lažje vgrajujemo lipofilne učinkovine. Vgradnja hidrofilnih učinkovin predstavlja izziv predvsem zaradi uhajanja učinkovine iz notranje v zunanjo vodno fazo.

Kljub temu pa obstajajo številne možnosti optimizacije vgradnje hidrofilnih učinkovin: izbira postopka izdelave, uporaba pomožnih snovi, ustrežna pH vrednost, neionizirana in ionizirana oblika učinkovine, molekulska masa polimera. Alternativna možnost je

kemijska vezava učinkovine preko razgradljive vezi, ki naj bi omogočila boljše vgradnjo učinkovine ter njeno kontrolirano sproščanje (8).



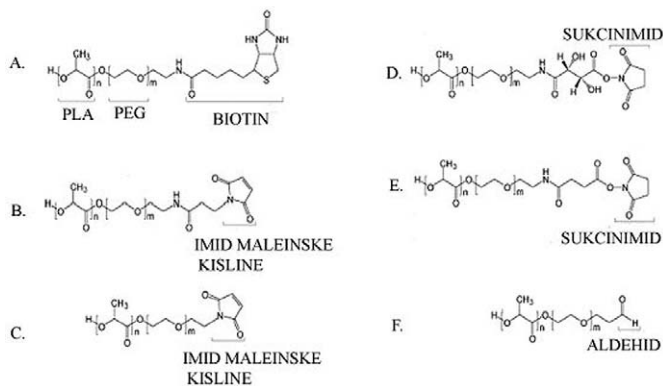
Slika 1: Vgradnja proteinske učinkovine v nanodelce z dvojno emulzijsko metodo (A) in nanoprecipitacijo (B). Sonikacija polimera, raztopljenega v organski fazi v prisotnosti vodne raztopine proteina vodi v nastanek emulzije  $V_1/O$ . Sonikacija emulzije  $V_1/O$  v prisotnosti večje količine zunanje vodne faze da emulzijo  $V_1/O/W_2$ . Po ekstrakciji organskega topila nastanejo nanodelci (A). Pri injiciranju raztopine polimera v organski fazi v vodno fazo s proteinom, se zgodi nanoprecipitacija. Po odparitvi organskega topila se tvorijo nanodelci (B).

Figure 1: Encapsulation of protein drug in nanoparticles by double-emulsion method (A) and nanoprecipitation (B). Sonication of polymer dissolved in organic phase in the presence of an aqueous protein solution leads to the formation of a  $W_1/O$  emulsion. Sonication of the  $W_1/O$  emulsion in the presence of outer aqueous phase gives a  $W_1/O/W_2$  emulsion. Nanoparticles arise after extraction of a liquid organic phase (A). When the solution of polymer in organic phase is injected into an aqueous solution with protein, the nanoprecipitation takes place after the solvent evaporation. The nanoparticles are formed after the solvent evaporation (B).

Ena najobetavnejših aplikacij nanodelcev je ciljana dostava peptidnih in proteinskih učinkovin (9). Zaradi njihove hidrofilne narave je običajna metoda priprave dvojna emulzijska metoda (10) ali nanoprecipitacija (slika 1).

### 2.2 Izdelava tarčno specifičnih nanodelcev

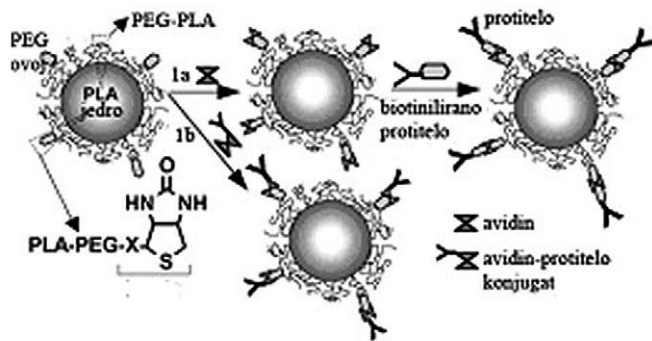
Največja prednost nanodelcev kot dostavnih sistemov je, da jih lahko konjugiramo s specifičnimi ligandi in dosežemo tarčno ciljanje. Tarčno specifične nanodelce lahko naredimo iz biopolimerov, na primer želatine ali serumskega albumina (11), pegiliranih PLGA kopolimerov z vgrajenimi reaktivnimi funkcionalnimi skupinami. Nedavno so sintetizirali številne kopolimere z uvedbo biotina (12), reaktivnimi amino (13) ter sulfhidrilnimi skupinami (14), ki jih lahko uporabimo za pritržitev proteinskih učinkovin v nadenaturirajočih pogojih (slika 2).



Slika 2: Struktura PEG-PLA kopolimera s funkcionalnimi skupinami. A-Biotin-PEG-PLA; B-maleinimido propionat PEG-PLA; C-maleinimid-PEG-PLA; D-sukcinimidil tartrat PEG-PLA; E-sukcinimidil sukcinat; F-aldehid-PEG-PLA.

Figure 2: Structure of functionalized PEG-PLA. A-Biotin-PEG-PLA; B-maleinimido propionate; C-maleimide-PEG-PLA; D-succinimidyl tartrate PEG-PLA; E-succinimidyl succinate PEG-PLA; F-aldehyde-PEG-PLA

Interakcija biotin-avidin je izredno močna ( $K_D = 10^{-15}$  M) in zelo primerna za povezavo nanodelcev z biotiniliranimi protelesi preko avidinskega vmesnika (15) oziroma za vezavo konjugatov avidin-protitelo na biotiniliran polimer nanodelcev (slika 3).



Slika 3: Priprava imunonanodelcev na osnovi interakcije biotin-avidin.

Figure 3: Manufacturing of immunonanoparticles via interaction biotin-avidin.

### 3 Specifično ciljanje imunskih celic z nanodelci

#### 3.1 Specifično ciljanje makrofagov z nanodelci

Makrofagi so imunske celice, ki služijo prepoznavanju in odstranjevanju spremenjenih in starajočih celic, delcev ter invazivnih mikrobov in so sposobni endocitoze makromolekulskih ligandov

preko številnih specializiranih receptorjev na plazemski membrani (16). Ciljana dostava učinkovin makrofagom je zlasti pomembna v primeru infekcijskih bolezni, pri katerih makrofagi služijo kot mesto proliferacije znotrajceličnih mikrobov (npr. pri tuberkulozi, brucelozi, legionarski bolezni, listeriozi, salmoneloz) (17). Večji vnos učinkovin v makrofage dosežemo z vgrajevanjem učinkovine v nanodelce, ki jih makrofagi fagocitirajo, kar znatno poveča učinkovitost delovanja. Tako so pri vezavi učinkovin amfotericina B, primakina ter tudi pentamidina na nanodelce dosegli večjo učinkovitost proti znotrajceličnemu patogenu *Leishmania donovani* in manjšo toksičnost v celičnih kulturah, kot v primeru raztopine (18, 19). Prednost ciljanega vnosa učinkovin z nanodelci je zlasti posledica selektivnega celičnega privzema in doseganja višjih koncentracij učinkovin v makrofagih (20).

Vlogo makrofagov so proučevali v kokulturi makrofagne celične linije J774.A1 in M5076 celic retikularnega sarkoma, ki so ji dodali nanodelce z doksorubicinom (21). Dokazali so, da je citotoksični učinek doksorubicina ( $IC_{50}$ ) 5 krat večji v kokulturi kot pa na samih celicah retikularnega sarkoma, in sicer tako v prosti obliki, kot vgrajenega v nanodelce. Kljub temu, da je prost ali v nanodelce vgrajen doksorubicin enako učinkovit v sistemu *in vitro*, pa ni tudi *in vivo*, saj vgradnja v nanodelce povzroči kopičenje v Kúpfferjevih celicah in s tem manjšo tkivno distribucijo kot pri prostem doksorubicinu. Makrofagi torej služijo kot rezervoar učinkovine po fagocitozi nanodelcev. Hkrati nanodelci povzročijo aktivacijo makrofagov, respiratorni izbruh ter sproščanje citotoksičnih dejavnikov iz makrofagov, kar učinkuje sinergistično doksorubicinu (21).

Pomembna terapevtska tarča so tudi monociti in makrofagi v aterosklerotičnih lezijah. Ko prepoznajo poškodbo, se aktivirajo in izražajo specifične celične adhezijske molekule, ki omogočajo migracijo v intimo žile, kjer izločajo vnetne citokine, kemokine in metaloproteaze matriksa, ki poslabšajo te lezije. Nanodelci predstavljajo obetaven pristop za modulacijo teh vnetnih procesov z dostavo anti-proliferativnih ter anti-remodelirajočih učinkovin na mesto vnetja. Z vgradnjo paklitaksela, močne anti-neoplastične učinkovine v albuminske nanodelce, so dosegli zmanjšanje rasti neointime po intravenski aplikaciji v kunce (22).

Makrofagi v centralnem živčnem sistemu povzročajo nevroinflamatorne bolezni in so pomembna tarča zlasti pri zdravljenju multiple skleroze (MS), vnetne bolezni centralnega živčevja. Pri eksperimentalnem alergijskem encefalomielitisu, ki služi kot živalski model MS, so pri podganah z odstranitvijo makrofagov uspeli preprečiti klinično manifestacijo bolezni (23). Znano je, da pri MS povečana prehodnost hematencefalne membrane omogoča prehod nanodelcev in so zato obetaven dostavni sistem za zdravljenje tovrstnih nevroloških motenj v prihodnosti.

Po endocitozi nanodelcev v makrofage, se le-ti prenesejo v lizosome, kjer se razgradijo in sprostijo učinkovino. Da bi se izognili razgradnji učinkovine v kislem okolju lizosoma so razvili nove strategije za dostavo učinkovine v citoplazmo. Za destabilizacijo lizosomske membrane dodajajo v nanodelce kationske površinsko aktivne snovi. Drugačen pristop izkorišča polimere s sposobnostjo ohranjanja pH vrednosti med 7.2 in 5.0, kot so polietilenimini (PEI) in imidazol-

vsebujoči polimeri, ki lahko pufrajo endosom in potencialno inducirajo njegovo predrtje (24). Klasični primer citoplazemske dostave je tudi uporaba pH občutljivih polimerov. Le-ti ostanejo nespremenjeni pri nevtralnem in bazičnem pH, v kislem okolju pa se razgradijo in destabilizirajo membrano lizosoma. Pri tem sprostijo svojo vsebino sprva v lizosom in nato v citoplazmo. Koncept citoplazemske dostave so izpopolnili s koenkapsulacijo listeriolizina O, ki permeabilizira membrano fagosoma za prehod nosilca.

## 3.2 Specifično ciljanje limfocitov z nanodelci

Limfociti so pomembne tarče za ciljano zdravljenje, zlasti v primeru njihove hiperproliferacije, ki je opazna pri avtoimunskih obolenjih, zavračanju presadkov in levkemijah. Imunoterapija, ki jo omogočajo specifična monoklonska protitelesa, usmerjena proti antigenskim označevalcem na limfocitih, zagotavlja specifično imunosupresijo in se uveljavlja kot obetavna alternativa klasičnim učinkovinam v hematologiji in onkologiji.

Za zelo učinkovito se je izkazala vgradnja citotoksičnih učinkovin v ogrodje nanodelcev z vezanimi protitelesi proti antigenom limfocitov. Prednost takšnega pristopa predstavlja kombinacija specifičnosti ter

znatno večje dostave. Za ciljano dostavo učinkovin limfocitnim celicam je bistvena izbira tarčnega antigena na limfocitih. Med monoklonskimi protitelesi, ki jih je Evropska agencija za zdravila odobrila za uporabo v terapevtske namene kot samostojne učinkovine ali v obliki konjugatov s toksini, kemoterapevtiki ali radionuklidi, jih je 10 usmerjenih proti antigenom limfocitnih celic (Preglednica 1).

### Monoklonska protitelesa za ciljanje limfocitov

Muromonab-CD3 se uporablja v terapiji za preprečevanje zavrnitve presadkov. Humanizirano anti-CD3 monoklonsko protitelo (HuM291) je usmerjeno proti invariantni  $\epsilon$  verigi T celičnega receptorja CD3 in inducira apoptozo selektivno v aktiviranih T limfocitih. Je v fazi kliničnih testiranj za terapijo CD3<sup>+</sup> T-celičnih limfomov (25). Dokazali so, da vezava nanodelcev s pritrjenimi protitelesi proti CD3 antigenu na limfocitih T sproži tudi receptorsko posredovano endocitozo. V primeru, da je v nanodelcih vgrajena citotoksična učinkovina, imajo nanodelci, označeni z anti-CD3 protitelesi, sinergistični učinek (15).

Pri ne-Hodgkinovem limfomu je tarčni antigen CD20, ki se nahaja na limfocitih B. CD20 je hidrofoben transmembranski protein, odgovoren za začetno aktivacijo celičnega ciklusa ter celične diferenciacije. Antigen najdemo na površini rakavih celic pri več kot 90% celic B ne-Hodgkinovih limfomov. Po vezavi rituksimaba se preko Fc regije protitelesa aktivira imunski odgovor. Predpostavljen mehanizem delovanja je vezava komplemента s posledično lizo celice (CDC, cell dependent cytotoxicity), ali pa pride do vezave Fc regije na receptor (FcR), ki se nahaja na celicah naravne imunosti in sledi odstranitev celice z aktivacijo celičnih efektorskih sistemov (ADCC, antibody dependent cell cytotoxicity). V *in vitro* poskusih so tudi nakazali možnost, da vezava protitelesa na CD20 sproži apoptotično smrt celice. Na ta način je povzročena smrt rakavih celic limfoma, vendar pa tudi normalnih limfocitov B. Beta sevanje <sup>90</sup>Y-ibritumomaba in <sup>131</sup>I-tositumimaba pa hkrati povzroči poškodbe celic s tvorbo prostih radikalov v tarčnih in sosednjih celicah. Patentirali so radioimunoterapijo ne-Hodgkinovega limfoma, ki temelji na uporabi radionuklidnih nanodelcev, označenih z monoklonskimi protitelesi. Osnovna strategija tovrstnega pristopa je povečana dostava in kopičenje radionuklida na tarčnem mestu, kjer povzroči terapevtsko sevanje.

Gemtuzumab je protitelo proti CD33 antigenu in je povezan z molekulami kaliheamicina preko bifunkcionalnega povezovalca. Pri vezavi protitelesa na antigen se tvori kompleks, ki se internalizira, nato pa se v lizosomih mieloidne celice sprosti kaliheamicin, ki se veže na DNA v področju malega žleba. Posledica vezave je prekinitve dvojne vijačnice DNA in smrt celice. Vgradnja kaliheamicina v nanodelce, ki bi bili označeni z anti-CD33 protitelesi bi povečala citotoksični učinek, saj bi v nanodelce lahko vgradili znatno več kaliheamicina napram 4-6 molekulam, ki se vežejo na eno molekulo protitelesa.

### 3.3 Dostava antigenov dendritičnim celicam z nanodelci

Dendritične celice so celice imunskega sistema v tkivih in so profesionalne APC, sposobne stimulacije naivnih T limfocitov pri primarnem imunskem odzivu. So močnejše APC kot monociti in makrofagi ali limfociti B. To imunostimulatorno kapaciteto gre pripisati visoki ravni izražanja MHC in kostimulatornih molekul (CD40, CD80 in

Leto odobritve	Monoklonsko protitelo (zdravilo)	Tarča zdravila	Vrsta	Indikacije
1986	Muromonab (Orthoclone OKT3 <sup>®</sup> )	CD3 na membrani limfocitov T	mišje IgG2a	zavrnitev presajenih organov
1997	Daclizumab (Zenepax <sup>®</sup> )	receptor za IL-2 na aktiviranih limfocitih T (CD25)	humanizirano IgG1	zavrnitev presajenih ledvic
1998	Rituksimab (Rituxan <sup>®</sup> )	CD20 na membrani limfocitov B	himerno IgG1	ne-Hodgkinov limfom
1998	Baziliksimumab (Simulect <sup>®</sup> )	receptor za IL-2 na aktiviranih limfocitih T (CD25)	himerno IgG1	zavrnitev presajenih ledvic
2000	Gemtuzumab (Mylotarg <sup>®</sup> )	CD33 na levkemijskih celicah	humanizirano IgG4-toksin konjugat	akutna mieloidna levkemija
2001	Alemtuzumab (MabCampath <sup>®</sup> )	CD52 na limfocitih T in B	humanizirano IgG1	kronična limfocitna levkemija
2002	<sup>90</sup> Y-ibritumomab (Zevalin <sup>®</sup> )	CD20 na membrani limfocitov B	mišje IgG1-radionuklid konjugat	ne-Hodgkinov limfom
2003	<sup>131</sup> I-tositumimab (Bexxar <sup>®</sup> )	CD20 na membrani limfocitov B	mišje IgG1-radionuklid konjugat	ne-Hodgkinov limfom
2003	Efalizumab (Raptiva <sup>®</sup> )	LFA-1 antigen na levkocitih	Humanizirano IgG	terapija psoriaze
2004	Natalizumab (Tysabri <sup>®</sup> )	$\alpha_4\beta_1$ in $\alpha_4\beta_7$ integrinov	humanizirano IgG4	multipla skleroza
2005	/	/	/	/

Preglednica 1: Monoklonska protitelesa, usmerjena proti imunskim celicam, registrirana kot učinkovine za klinično uporabo pri Evropski agenciji za zdravila (EMA).

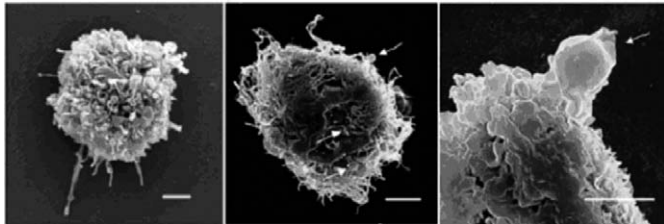
Table 1: Monoclonal antibodies against immune cells, approved by European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA).



CD86), kot tudi njihovi sposobnosti produkcije citokinov IL-12 in IFN- $\alpha$ . Zatorej je splošno mnenje, da je tarčno ciljanje dendritičnih celic bistveno za razvoj uspešnega imunskega odgovora.

Dendritične celice privzamejo raztopino proteinov, peptidov, celičnih lizatov ter RNA in DNA, z namenom indukcije antigen-specifičnega imunskega odziva, saj te spojine same ne zmorejo inducirati močnega in širokega imunskega odziva, pač pa se morajo v APC razgraditi v imunogene peptide. Proteinske učinkovine običajno sprožijo močan humoralni imunski odziv, vendar šibak T celični citotoksični odziv (CTL). Zatorej je potrebno uveljaviti nove strategije, ki bi izvale močan celični in tudi humoralni imunski odziv. Nanodelci so zlasti zanimivi kot stabilni dostavni sistem antigenov (26) za aktivacijo T celično posredovanega imunskega odziva (27), saj omogočajo tako kontrolirano dostavo, kot tudi zaščito antigena. Lahko uravnavajo posamezne imunске odzive, vključno s povečanim odzivom CTL (28). Dendritične celice, stimulirane z nanodelci z majhnimi količinami antigena, lahko sprožijo močno T- celično proliferacijo in indukcijo IFN- $\gamma$ . Sam učinek nanodelcev na dozorevanje dendritičnih celic pa je majhen.

Privzem biorazgradljivih PLGA delcev je pri dendritičnih celicah skoraj tako učinkovit kot pri visoko fagocitnih makrofagih in je odvisen od velikosti delcev, funkcionalnih skupin na površini in zeta potenciala (29). Nezrele dendritične celice močno privzemajo antigen, vendar pa se privzem zmanjša po dozorevanju in migraciji dendritičnih celic v sekundarne limfatične organe. Tako nezrele kot zrele dendritične celice privzemajo učinkoviteje z antigenom napolnjene nanodelce ter prazne nanodelce, ne pa tudi samih antigenov (slika 4). Eksogeni antigeni vstopijo v celice preko receptorsko posredovane endocitoze ali pinocitoze, nanodelci pa s fagocitozo (30).



Slika 4: Fagocitoza PLGA nanodelca (bela puščica) v dendritične celice. SEM posnetki kažejo dendritično celico (levo), privzem nanodelca (sredina) in ovijanje membrane okoli delca (desno). Merilo = 1  $\mu$ m (38).

Figure 4: Phagocytosis of PLGA nanoparticle (white arrow) by dendritic cells. Scanning electron microscope photomicrographs show dendritic cell (left), uptake of nanoparticle (middle) and wrapping up of cell membrane (right). Bar = 1  $\mu$ m (38).

Povečana fagocitoza nanodelcev z antigenom lahko povzroči preobremenitev endosomov in pride do odpuščanja antigena v citosol, kjer se veže na sintetizirane MHC I molekule in se predstavlja CD8<sup>+</sup> citotoksičnim T limfocitom (navzkrižna predstavitev). Torej lahko dendritične celice predstavljajo proteine, dostavljene z nanodelci preko MHC I in II molekul in sprožijo CD8<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> imunski odziv, kar

je bistveno pri sprožanju učinkovitega imunskega sistema pri tumorskih obolenjih in infekcijskih boleznih.

V tem pomenu so dendritične celice pomembna tarča za dostavo cepiv z nanodelci, saj učinkovita dostava bodisi proteinov ali genskega materiala po predstavitvi na MHC molekulah omogoča učinkovit imunski odziv. Profilaktično cepivo, ki ga sestavlja neaktivni HIV-1-konkanavalin A, imobiliziran na nanodelcih (HIV-ND), so dali miškam. HIV-ND so fagocitirale dendritične celice v pljučih in sprožile močan protitelesni imunski odziv v genitalnem predelu ter specifični citotoksični imunski odziv v vranici (31).

Dendritične celice vsebujejo številne površinske molekule, ki jih lahko koristimo za ciljno dostavo s tarčno specifičnimi nanodelci. Znani primeri površinskih molekul so: CD1a (MHC-II), ki je antigen predstavitvena molekula, CD86, CD80 in CD40 so kostimulatorne molekule, CD83 je označevalec dozorevanja, CCR7 je kemokinski receptor, vključen v transport zrelih dendritičnih celic v T celično področje bezgavk. Dodatek nanodelcev tudi spremeni raven izražanja različnih površinskih molekul dendritičnih celic, kar dodatno poveča ciljno dostavo (32).

## 4 Zaključek

Tarčno specifični nanodelci so dostavni sistemi izbora za zdravilne učinkovine in antigene celicam imunskega sistema v primeru številnih imunskih pomanjkljivosti, kot so imunska obolenja ter boleznim, kjer je imunski sistem kompromitiran in ne nudi ustreznega odziva, kot so rakava obolenja, virusne infekcije ter infekcije z znotrajceličnimi patogeni.

Sprožijo željen imunski odziv po predelavi antigena v antigen predstavitvenih celicah. Dostava antigenov APC z nanodelci sproži celovit efektivski imunski odziv, in sicer močan protitelesni imunski odziv in povečanje odziva citotoksičnih limfocitov proti antigenom, ki so bili vgrajeni v nanodelce. V tem smislu razvijajo nanodelce za vaccine, ki omogočajo znatno višje odzive, kot jih nudijo trenutno uporabljane adjuvantne spojine (alum, QuilA, monofosforil lipid A). Glede na nastajanje protiteles so odzivi primerljivi imunizaciji s kompletnim Freundovim adjuvansom in pri CD8<sup>+</sup> celičnem odzivu primerljivi *ex vivo* pulzirajoči imunizaciji dendritičnih celic. Po drugi strani pa tolerogene dendritične celice sprožijo odziv regulatornih T limfocitov ter imunske tolerance in so terapevtska tarča v primeru avtoimunih obolenj ter pri zavračanju presadkov.

V primeru zdravljenja prekomernega celičnega ali humoralnega imunskega odziva (avtoimunska obolenja ali zavračanje presajenih organov) pa so zlasti limfociti primerna tarča za nanodelce. Na podlagi specifičnih limfocitnih površinskih molekul lahko dosežemo ciljno dostavo kljub neenakomerni porazdelitvi teh celic v organizmu, vgradnja učinkovin v nanodelce pa omogoča dostavo večjih količin učinkovine in s tem močnejši terapevtski odziv.

Prihodnost tega izredno hitro razvijajočega področja obeta izboljšanje nanodelcev kot nosilnih sistemov. Razen vloge nosilca lahko dosejajo tudi ciljanje določenih tkiv, celic in organel. Uporaba polimernih nanodelcev kot nosilcev učinkovin je že dobro raziskana. Razvoj nanodelcev za ciljno dostavo učinkovine s pomočjo vezanih ligandov, je v teku. Preučevanje nanodelcev, ki bi dosegali tako

dostavo učinkovine, ciljanje, kot tudi diagnostični ali terapevtski odziv, pa je šele na zasnovnem nivoju, vendar obstaja velika verjetnost za njihov uspešen razvoj in uporabo.

### Literatura

1. Pardoll DM. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002, 2: 227-238.
2. Ochseinbein AF. Principles of tumor Immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Ther* 2002, 124: 12398-12399.
3. Cegnar M, Kristl J, Kos J. Oblikovanje nanodelcev s proteini. *Farm Vest* 2003, 54: 37-46.
4. Kreuter J. Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. I. Preparation methods. *Pharm Acta Helv* 1983, 58: 196-209.
5. Li JK, Wang N, Wu XS. A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery. *J Pharm Sci* 1997, 86: 891-5.
6. Jelinkova M, Strohalm J, Plocova D, Subr V, Stasny M, Ulbrich K, Richova B. Targeting of human and mouse T-lymphocytes by monoclonal antibody-hpma copolymer-doxorubicin conjugates directed against different T-cell surface antigens. *J Control Release* 1998, 52: 253-70.
7. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 2000, 65: 271-84.
8. Govender T, Riley T, Ehtezazi T, Garnett MC, Stolnik S, Illum L, Davis SS. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *Int J Pharm* 2000, 199: 95-110.
9. Cegnar M, Kos J, Kristl J. Cystatin incorporated in poly-(lactide-co-glycolide) nanoparticles: development and fundamental studies on preservation of its activity. *Eur J Pharm Sci* 2004, 22: 357-364.
10. Li Y, Pei Y, Zhang X, Gu Z, Zhou Z, Yuan W et al. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Control Release* 2001, 71: 203-211.
11. Weber C, Reiss S, Langer K. Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups. *Int J Pharm* 2000, 211: 67-78.
12. Salem AK, Cannizzaro SM, Davies MC, Tendler SJ, Roberts CJ, Williams PM, et al. Synthesis and characterisation of a degradable poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) copolymer with biotinylated end groups. *Biomacromolecules* 2001, 2: 575-580.
13. Tessmar J, Mikos A, Gopferich A. Amine-reactive biodegradable diblock copolymers. *Biomacromolecules* 2002, 3: 194-200.
14. Olivier JC, Huertas R, Lee HJ, Calon F, Pardridge WM. Synthesis of pegylated immunonanoparticles. *Pharm Res* 2002, 19: 1137-1143.
15. Dinauer N, Balthasar S, Weber C, Kreuter J, Langer K, von Briesen H. Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes. 2005, 26: 5898-5906.
16. Gordon S. The macrophage. *Bioessays* 1995, 17: 977-986.
17. Poznansky M, Juliano RL. Biological approaches to the controlled delivery of drugs: a critical review. *Pharmacol Rev* 1984, 26: 277-336.
18. Espuelas MS, Legrand P, Loiseau PM, Bories C, Barratt G, Irache JM. In vitro antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(epsilon-caprolactone) nanospheres. *J Drug Target* 2002, 10: 593-599.
19. Deniau M, Durand R, Bories C, Paul M, Astier A, Couvreur P, Houin R. In vitro study of leishmanicidal agents with drug carriers. *Ann Parasitol Hum Comp* 1993, 68: 34-37.
20. Alving CR. Macrophages as targets for delivery of liposomes encapsulated antimicrobial agents. *Adv Drug Del Rev* 1988, 2: 107-28.
21. Soma CE, Dubernet C, Barratt G, Benita S, Couvreur P. Investigation of the role of macrophages on the cytotoxicity of doxorubicin-loaded nanoparticles on M5076 cells in vitro. *J Control Release* 2000, 68: 283-289.
22. Kolodgie FD, John M, Khurana C, Farb A, Wilson PS, Acampado E, Desai N, Soon-Shiong P, Virmani R. Sustained reduction of in-stent neointimal growth with the use of a novel systemic nanoparticle paclitaxel. *Circulation* 2002, 106: 1195-1198.
23. Huitinga I, van Rooijen N, de Groot CJA, Uitdehaag BMJ, Dijkstra CD. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med* 1990, 172: 1025-33.
24. Pack DW, Putnam D, Langer R. Design of imidazole-containing endosomolytic biopolymers for gene delivery. *Biotechnol Bioeng* 2000, 67: 217-23.
25. Waldmann TA, Levy R, Collier BS. Emerging therapies: spectrum of applications of monoclonal antibody therapy. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000, 394-408.
26. Raychaudhuri S, Rock KL. Fully mobilizing host defense: building better vaccines. *Nat Biotechnol* 1998, 16: 1025-31.
27. Wang X, Uto T, Sato K, Ide K, Agaki T, Okamoto M, Kaneko T, Akashi M, Baba M. Potent activation of antigen-specific T-cells by antigen loaded nanoparticles. *Immunol Lett* 2005, 98:123-130.
28. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Palendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000, 18: 767-811.
29. Thiele L, Rothen-Rutishauser B, Jilek S, Wunderli-Allenspach H, Merckle HP, Walter E. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does Phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J Control Release* 2001, 76: 59-71.
30. Lutsiak ME, Robinson DR, Coester C, Kwon GS, Samuel J. Analysis of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanosphere uptake by human dendritic cells and macrophages in vitro. *Pharm Res* 2002, 19: 1480-7.
31. Kawamura M, Wang X, Uto T, Sato K, Ueno M, Akagi K, Hiraishi K, Matsuyama T, Akashi M, Baba M. Induction of dendritic cell-mediated immune responses against HIV-1 by antigen-capturing nanospheres in mice. *J Med Virol* 2005, 76: 7-15.
32. Diwan M, Elamanchili P, Lane H, Gainer A, Samuel J. Biodegradable nanoparticle mediated antigen delivery to human blood derived dendritic cells for induction of primary T cell responses. *J Drug Targeting* 2003, 11: 495-507.