

Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi

Tumor-specific targeting of drugs by liposomes

Nina Kočevar, Julijana Kristl

POVZETEK: Liposomi so danes predmet intenzivnih raziskav na področju zdravljenja rakavih obolenj. Novejši liposomski sistemi omogočajo doseganje dobrih terapevtskih učinkov, ki so posledica zmanjšane toksičnosti zaradi omejenega porazdeljevanja učinkovin v zdrava tkiva in povečanega zadrževanja v tumorjih. Poleg tega predstavljajo tudi velik potencial v genski terapiji. V članku so predstavljene novejšje strategije oblikovanja liposomskih sistemov, s katerimi dosegamo selektivno kopičenje učinkovin v tumorskih celicah in nadzorovano sproščanje.

Ključne besede: liposomi, tumorske celice, ciljano dostavljanje, ciljano sproščanje, genska terapija

ABSTRACT: Liposomes have been studied extensively as drug carriers in cancer therapy. Advanced strategies can decrease toxicity and therefore enhance therapeutic effects through limited distribution to healthy tissues and selective accumulation at the diseased site. Liposomes also offer a promising potential in gene therapy. The article represents some novel developments in liposome-based drug delivery that enhance tumor-specific targeting and controlled drug release.

Key words: liposomes, tumor cells, targeted delivery, targeted release, gene therapy

1 Uvod

Odkrivanje novih učinkovitejših protitumornih učinkovin postaja vodilna smer razvoja farmacevtske znanosti in je posledica naraščajočega števila rakavih obolenj v svetovnem merilu. Obetavni citostatični učinkini številnih novih molekul na celičnih kulturah so le začetek zahtevnih raziskav, ki pa se velikokrat končajo zaradi slabe terapevtske učinkovitosti oziroma hudih toksičnih učinkov kot posledice neselektivnega delovanja na zdrava tkiva.

Liposomi so danes predmet intenzivnega raziskovanja na področju razvoja novih farmacevtskih oblik za zdravljenje rakavih obolenj. Omogočajo doseganje optimalnih terapevtskih učinkov, ki so posledica podaljšanega zadrževanja v centralnem krvnem obtoku, visoke stopnje kopičenja v tumorskem tkivu ter nadzorovanega sproščanja učinkovine s hitrim privzemom v rakave celice.

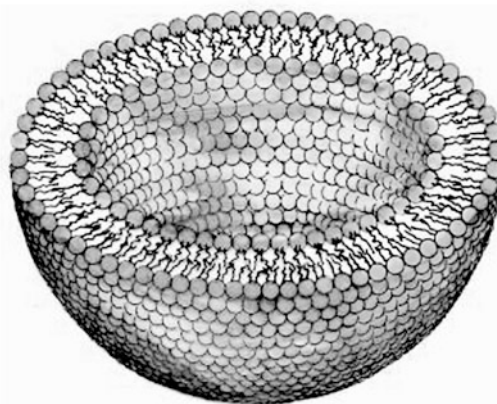
2 Značilnosti liposomov

Liposomi so mikroskopski lipidni vezikli velikosti od 20 nm do 4 μ m (slika 1). Sestavljeni so iz enega (enoslojni liposomi) ali več lipidnih dvoslojev, ki so urejeni koncentrično in vsebujejo enako število prostorov z vodo (večslojni liposomi). Manjši enoslojni liposomi dosegajo velikosti 20-100 nm, večji enoslojni 100-800 nm, večslojni pa 100-4000 nm. Debelina lipidnega dvosloja je 4 nm (1, 2).

Glavne sestavine membrane liposoma so fosfolipidi (slika 2) in holesterol, ki zmanjša prepustnost za hidrofilne molekule ter poveča stabilnost v prisotnosti bioloških tekočin, kot sta kri oziroma plazma (3).

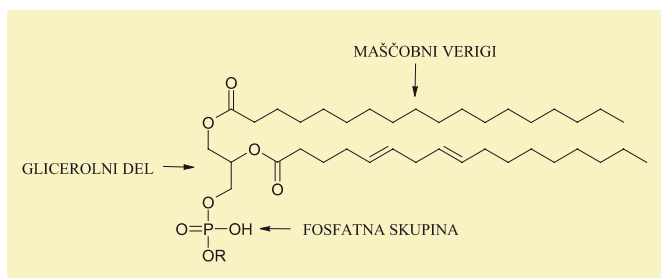
V liposome lahko vgrajujemo tako hidrofilne in amfifilne kot tudi lipofilne učinkovine (nizkomolekularne učinkovine, peptide, proteine, RNK, DNK). Hidrofilne se nahajajo v vodnem mediju v osrednjem delu liposoma in ob njegovi membrani. Amfifilne so razporejene ob membrani in se z lipofilnim delom vanjo delno vgradijo. Lipofilne učinkovine pa so popolnoma vključene v lipidni dvosloj (4).

Liposomi prihajajo v stik s celicami na štiri načine: z adsorpcijo na celično membrano, zlitjem in izmenjavo lipidnih komponent z njo ter endocitozo kot najpomembnejšo vrsto interakcij (slika 3) (2, 5).



Slika 1: Shematska predstavitev enoslojnega liposoma

Figure 1: Schematic representation of an unilamellar liposome



Slika 2: Molekula fosfolipida – najpogosteje uporabljane maščobne kisline so lavrinska, miristinska, oleinska, palmitinska in stearinska, alkoholi (R) pa etanolamin, glicerol in holin.

Figure 2: A phospholipid molecule – the most used fatty acids are lauryl, myristic, oleic, palmitic and stearic acid and alcohols (R) ethanolamine, glycerol and cholin.

3 Liposomi kot dostavni sistemi za protitumorske učinkovine

Osnovni pogoj za doseganje optimalnih terapevtskih učinkov je izpolnitev treh pomembnih zahtev: podaljšano zadrževanje liposomov v centralnem krvnem obtoku, visoka stopnja kopičenja v tumorskem tkivu ter kontrolirano sproščanje učinkovine s hitrim privzemom v rakave celice (6).

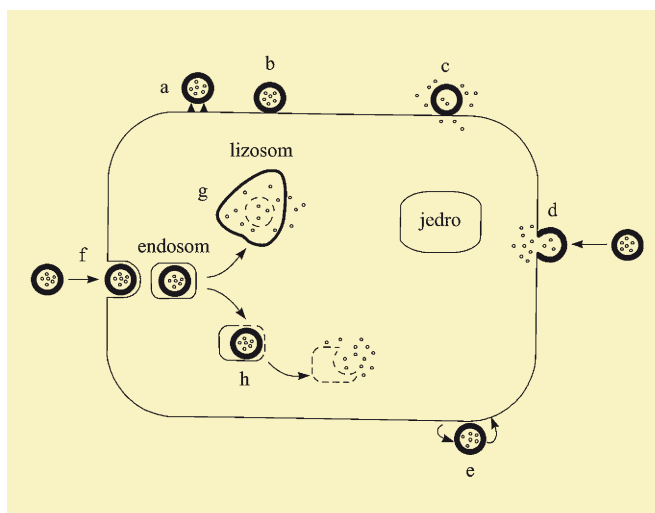
Razvoj liposomskih sistemov se je začel s prvo generacijo, ki jo predstavljajo strukturno najenostavnejši liposomi (slika 4, preglednica 1). Zanje je značilno, da jih retikuloendotelijski sistem zelo hitro odstrani iz krvi (6).

V drugo generacijo uvrščamo sterično stabilizirane sisteme, ki imajo membrano prekrito z molekulami hidrofilnega polietilenglikola (PEG; slika 5). Pegilirani lipidi s stopnjo polimerizacije od 30 do 120 navadno predstavljajo 5 molskih odstotkov lipidnega dela. Površina liposoma je zato močno hidratirana in zaščitena pred adsorpcijo na plazemske proteine in opsonizacijo. Razpolovni čas v krvi s tem podaljšamo tudi do 72 ur (6).

Preglednica 1: Razdelitev liposomov glede na zapletenost zgradbe lipidnega dvosloja, njihove funkcionalne in biološke lastnosti ter stopnja razvoja (6)

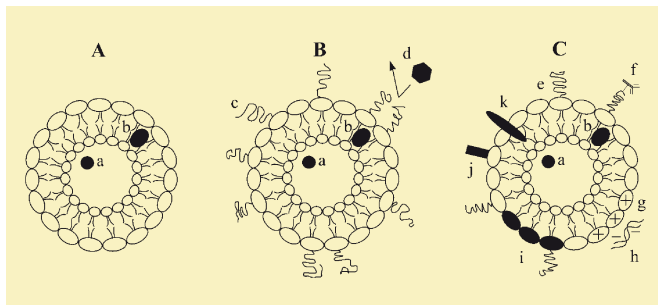
Table 1: Liposome classification according to their membrane complexity, functional and biological properties and stage of development (6)

	OPIS	PREDNOST	STOPNJA RAZVOJA
PRVA GENERACIJA	enostavni liposomi: naravni ali sintezni fosfolipidi	↓ toksičnost, ↑ učinkovitost pasivno akumuliranje v tumorju	odobrena pri FDA
DRUGA GENERACIJA	sterično stabilizirani liposomi: pegilirani lipidi	↑ $t_{1/2}$, izboljšano pasivno akumuliranje v tumorju	odobrena pri FDA
TRETJA GENERACIJA	sterično stabilizirani liposomi z ligandi za ciljano dostavo in kontrolirano sproščanje	↑ terapevtski indeks ciljana dostava, sproščanje	eksperimentalno



Slika 3: Vrste in posledice interakcij med liposomi in celicami: specifična (a) in nespecifična (b) adsorpcija na površino celice s posledično destabilizacijo membrane liposoma in mikropinocitozo sproščene učinkovine (c); zlitje s celično membrano (d) in sprostitvev učinkovine direktno v citoplazmo; izmenjava lipidnih molekul s celično membrano (e); specifična ali nespecifična endocitoza (f) in nastanek endosoma s posledično združitvijo z lizosomom in razgradnjo vsebine (g) ali z razpadom membrane endosoma (h) in sprostitvijo učinkovine v citoplazmo.

Figure 3: Liposome-cell interactions and their effects: specific (a) and non-specific (b) adsorption onto the cell surface with subsequent destabilization of liposome membrane and micropinocytosis of the released drug (c); fusion with the cell membrane (d) and drug release directly into the cytoplasm; exchange of lipid molecules with the cell membrane (e); specific or non-specific endocytosis (f) and the formation of an endosome with subsequent fusion with the lysosome and drug degradation (g) or with subsequent endosome membrane degradation (h) and drug release into the cytoplasm.



Slika 4: Shematska predstavitev enoslojnih liposomov z različno stopnjo kompleksnosti lipidnega dvosloja. **A:** Enostavni liposom z vgrajenima hidrofilno (a) in lipofilno učinkovino (b). **B:** Sterično stabilizirani liposom z molekulami PEG (c), ki ščitijo površino liposoma pred opsonizirajočimi proteini (d). **C:** Različno modificirani sterično stabilizirani liposom tretje generacije – veriga PEG (e), veriga PEG z ligandom za ciljano dostavo (f), kationski lipidi (g), ki omogočajo vgrajevanje DNK (h), fuzogeni lipidi (i), lipidni konjugati, ki omogočajo ciljano sproščanje učinkovine (j), fuzogeni virusni proteini (k).

Figure 4: Schematic representation of unilamellar liposomes with different degrees of membrane complexity. **A:** Plain liposome with incorporated hydrophilic (a) and lipophilic drug (b). **B:** Sterically stabilized liposome with PEG molecules (c), which protect the liposome from opsonizing proteins (d). **C:** Different modifications of sterically stabilized third generation liposome: PEG chain (e), PEG chain with targeting ligand (f), cationic lipids (g) which enable the incorporation of DNA (h), fusogenic lipids (i), lipid conjugates, which enable site-specific drug release (j), fusogenic viral proteins (k).

Predstavniki tretje generacije so prav tako sterično stabilizirani pegilirani liposomi, ki pa na svoji površini vsebujejo tudi informacijo za ciljano dostavo učinkovine v tumorsko tkivo oziroma ciljano sproščanje učinkovine. Prvi pristop temelji na pripenjanju ligandov, ki so sposobni prepoznati specifične tarčne molekule na tumorskih celicah, drugi pa na specifičnih dejavnikih, ki sprožijo sprostitve učinkovine. Kombinacija obeh omenjenih pristopov – dostava učinkovine na specifično mesto in sledeče sproščanje – značilno poveča koncentracijo učinkovine v tumorju in s tem biološko uporabnost (6, 7).

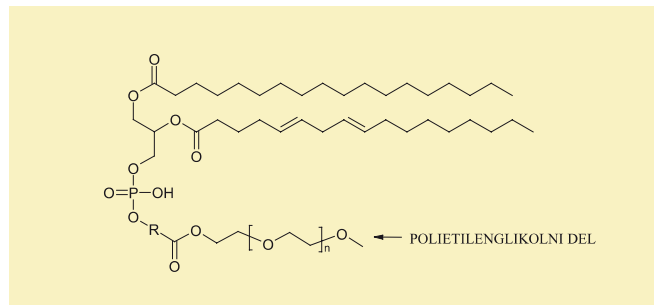
Dokazano je, da se liposomi v veliki meri kopičijo v tumorskem tkivu, kar je posledica dobro prepustnih žil in odsotnosti limfnega sistema (6). Velikost por žilnih sten v tumorskem tkivu se giblje v območju 100-780 nm, medtem ko znaša v normalnem ožilju manj kot 6 nm.

3.1 Ciljano dostavljanje

Povečano količino protitumorne učinkovine v rakavem tkivu lahko dosežemo s procesom ciljane dostave. Liposomi na svoji površini nosijo ligande (protitelesa ali njihove fragmente, proteine, glikoproteine, ogljikove hidrate), ki prepoznajo tarčni antigen ali receptor na membrani tumorske oziroma endotelijske neovaskularne celice (7, 8, 9).

3.1.1 Ciljanje s protitelesi

S protitelesi prekrute liposome imenujemo tudi imunoliposomi. Protitelesa lahko priprnemo direktno na polarni fosfolipidni del ali na



Slika 5: Molekula pegiliranega fosfolipida

Figure 5: A pegylated phospholipid molecule

končni del verige polietilenglikola. Slednji pristop daje ugodnejše rezultate, saj protitelo lažje doseže antigen.

Število na liposom pripetih protiteles odloča o stopnji vezave na tumorsko celico, poudariti pa je potrebno, da je hkrati sorazmerno z obsegom odstranjevanja veziklov z retikuloendotelijskim sistemom. Optimalno razmerje med dostavo učinkovine do tumorskega tkiva in še sprejemljivim povečanjem privzema v monocite in makrofage dosežemo z vezavo 10-30 molekul protiteles na liposom.

Primeri laboratorijskih raziskav s to vrsto liposomov na živalih dajejo dobre rezultate. Z imunoliposomi z monoklonskim protitelesom IgG 34A proti glikoproteinskemu receptorju gp112 na pulmonalnih endotelijskih celicah miši so tako ugotovili, da se že po 30 minutah več kot 50 % odmerka nahaja v pljučih (7).

V drugi študiji so uporabljali na pH občutljive liposome (3.2.1) z doksorubicinom, prekrute s protitelesi proti receptorju CD19 na limfomskih celicah B. Miši, ki so prejemale doksorubicin, so dosegale v primerjavi s kontrolno skupino značilno višje stopnje preživetja (9).

3.1.2 Ciljanje na integrinski receptor

Nekatere vrste integrinskih receptorjev ($\alpha v \beta 3$ in $\alpha 5 \beta 1$) so prekomerno izražene na neovaskularnih celicah tumorjev, ki nastajajo v procesu tumorske angiogeneze (10). Za vezavo peptidnega liganda na te integrine je ključnega pomena njegovo aminokislinsko zaporedje Arg-Gly-Asp (sekvenca RGD). Z liposomi, ki imajo na terminalnem polietilenglikolnem delu vezano zaporedje RGD, dosežemo značilno večjo protitumorno aktivnost (7).

3.1.3 Ciljanje na folatni receptor

Folna kislina je vitaminska substanca, ki jo celice transportirajo v svojo notranjost preko folatnega membranskega prenašalca ali folatnega receptorja; prvi se nahaja praktično v vseh normalnih celicah, drugi pa na endotelijskih celicah, aktiviranih makrofagih in rakavih celicah. Prekomerna ekspresija folatnega receptorja na hitro delečih se tumorskih celicah predstavlja mehanizem, ki ga izkoriščamo za ciljano dostavo liposomov do tumorja – prekrijemo jih s folatnimi molekulami.

V eksperimentih *in vitro* na celičnih linijah HeLa in KB so uporabljali liposome z doksorubicinom, prekrute s folatom. Raziskovalci so dokazali značilno povečan privzem učinkovine, poleg tega pa so nakazali tudi možnost, da se s takšnim načinom dostave učinkovine izognemo rezistenci (7).

Omeniti moramo tudi naraščajoče zanimanje za nove specifične peptidne ligande, pridobljene z metodami bakteriofagnega prikaza. Gre za posebne proteine, ki so sposobni penetrirati v tumorske celice in v pogojih *in vivo* že dajejo zelo obetavne rezultate (11).

3.2 Ciljano sproščanje

Z liposomi, pri katerih akumuliranje v tumorju dosežemo le s ciljanim dostavljanjem, niso dosegli značilno boljše terapevtske učinkovitosti v primerjavi z enostavnimi pegiliranimi liposomi. Razlog leži v lizosomski razgradnji, do katere pride po vstopu liposoma v rakavo celico. Da bi se liposom razgradnji izognil, bi moral iz endosoma takoj difundirati oziroma hitro sprostiti učinkovino v citoplazmo.

Raziskovalci so razvili kar nekaj pristopov za doseganje ciljanega sproščanja v tumorskih tkivih, ki so predstavljeni v nadaljevanju (7).

3.2.1 S spremembo pH-ja povzročeno ciljano sproščanje

Prvotna ideja o razpadu v krvnem obtoku sicer stabilnih liposomov in sprostitvi učinkovine v metabolno aktivnem tumorskem tkivu (pH približno 6,5) ni dala želenih rezultatov. Priprava liposomov, ki bi prepoznali tako majhne razlike pH-ja, namreč s tehnološkega vidika ni izvedljiva. Raziskovalci so se zato osredotočili na zelo kislo okolje v endosomih in lizosomih, kjer pH pade pod 5. Liposomi, ki omogočajo tak pristop, imajo posebno sposobnost, da se ob spremembi pH-ja zlijejo z membrano endosoma ali lizosoma (fuzogeni liposomi). Učinkovina se pri tem sprosti v celično citoplazmo. V raziskovalnih krogih ta pristop v kombinaciji s ciljano dostavo štejejo za eno izmed najobetavnejših možnosti učinkovite protitumorne terapije.

3.2.2 S svetlobo povzročeno ciljano sproščanje

Fotosenzitivnost liposomov dosežemo z vgraditvijo fosfolipidnih molekul, ki po fotoekscitaciji z vidno ali UV-svetlobo izomerizirajo, razpadejo ali polimerizirajo. Ti procesi povzročijo spremembe v strukturi lipidne membrane (izomerizacija *cis-trans*, hidroliza ali premreženje lipidov), ki postane prepustna zaradi nastalih defektov in sprosti učinkovino. Te metode še vedno razvijajo le na eksperimentalnem nivoju in njihova učinkovitost *in vivo* ni dokazana. Veliko pomanjkljivost predstavlja tudi dejstvo, da predpostavljajo lokalizacijo tumorja, kar je v realnosti le redko primer, saj večina rakavih bolnikov umre zaradi metastazne razširitve bolezni.

3.2.3 S toploto povzročeno ciljano sproščanje

Tudi ta način je omejen na lokalizirane tumorje, ki morajo biti viru toplote dobro dostopni. Zaenkrat ga uporabljamo le za zdravljenje površinskih tumorjev, ki jih ne moremo odstraniti kirurško.

Nasprotno pa ta način v primerjavi z drugimi načini ciljanega sproščanja prinaša pomembne prednosti. Zaradi povišane temperature na mestu tumorja prihaja do kopičenja liposomov v tkivu, ki je posledica povečane prekrvavitve in povečane žilne permeabilnosti. Dokazano je celo, da je hipertermija že sama po sebi citotoksična.

Termosenzibilni liposomi morajo izkazovati dve pomembni lastnosti: fazni prehod mora biti le rahlo višji od fiziološke telesne temperature, hkrati pa mora obsegati zelo ozko temperaturno območje. Učinkovini s tem omogočimo, da se po spremembi integritete membrane ob temperaturi faznega prehoda hitro in popolnoma sprosti.

3.2.4 Z encimi povzročeno ciljano sproščanje

V rakavih tkivih je zaradi povečanega metabolizma večje izražanje določenih vrst encimov. To lastnost izkoriščamo pri pripravi liposomov, sestavljenih iz lipidnih konjugatov, ki so občutljivi na celične proteaze. Pod vplivom teh encimov pride do cepitve konjugatov, iz katerih nastanejo fuzogeni lipidi in povzročijo zlitje liposoma z membrano endogenega vezikla.

V literaturi najdemo še številne metode. Uporaba alkalne fosfatase temelji na vgraditvi fosfoholesterola v lipidni dvosloj, kar vodi do odcepitev fosfatne skupine iz holesterola in hitre destabilizacije liposoma. Fosfolipaza A₂ cepi fosfolipidne molekule, zaradi česar pride do razpada liposomov in sprostitve učinkovine. Proučujejo tudi primernost transglutaminaze, sfingomielinaze in fosfolipaze C.

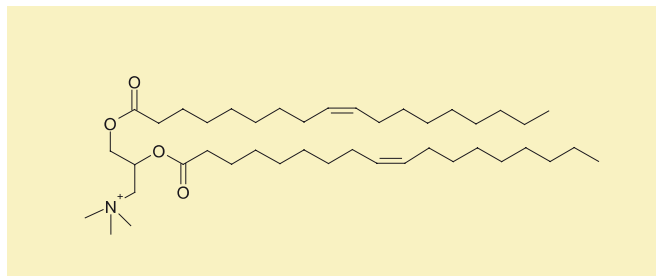
4 Liposomi v genski terapiji rakavih obolenj

Osnovni cilj genske terapije je uspešen vnos genskega materiala v tarčno tkivo. Genska terapija rakavih celic posega v procese ekspresije tumorskih supresorskih genov, ki inducirajo apoptozo, in onkogenov, ki sodelujejo pri proliferaciji. Z geni za citokine pa se vpleta tudi v procese imunskega sistema.

Sistemi za dostavo DNK do celic so biološki (virusni) in nebiološki (kationski polimeri, kationski peptidi in kationski lipidi). Liposomi iz kationskih lipidov z vgrajenim genetskim materialom se imenujejo tudi lipopleksi ali genosomi in so za razliko od klasičnih liposomov, katerih membrana je nevtralna ali negativna, pozitivno nabiti (12).

Tipičen primer kationskega lipida, ki ga pogosto uporabljamo, je DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilaminopropan; slika 6). V vodnem okolju se negativno nabita DNK najprej razporedi tik ob zunanji, pozitivno nabiti površini membrane liposoma. Zaradi elektrostatskih interakcij med molekulami DNK in lipidi začne nato prihajati do agregacije in zlivanja liposomov, pri čemer se DNK vgradi v njihovo notranjost. Liposomi, ki nastanejo, so večslojne oblike (12, 13).

Glavna omejitev uporabnosti liposomov iz kationskih lipidov je njihova toksičnost. Kot pozitivno nabiti delci inducirajo agregacijo fiziološko prisotnih makromolekul in celic v krvi (agregacija trombocitov, plazemskih proteinov), kar lahko povzroči hemolizo (2).



Slika 6: Molekula kationskega lipida DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilaminopropan)

Figure 6: The cationic lipid DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonio-propane).

Ena od uspešnejših smeri razvoja liposomov na področju dostave genov so virosomi. Gre za kationske liposome, ki imajo v membrano vgrajene ali nanjo pripete fuzogene proteine virusne ovojnice (14). Po vezavi virosomov na celico pride do fuzije z membrano in direktne sprostitve DNK v citoplazmo, s čimer se izognemo razgradnji učinkovine v endosomih in lizosomih. Zlitje z membrano se v primerjavi s klasičnimi liposomi iz kationskih lipidov konča veliko hitreje (15).

5 Sklep

Liposomi so danes eni izmed najbolj proučevanih dostavnih sistemov za zdravljenje rakavih obolenj. Na splošno niso toksični niti imunogeni in so kompatibilni s številnimi citostatiki. Ker je učinkovina ujeta v njihovi notranjosti, predstavljajo dobro zaščito pred kemijsko in metabolično razgradnjo po injiciranju v krvni obtok. Toksičnost je močno zmanjšana zaradi omejene porazdelitve citostatika v zdrava tkiva, učinkovitost pa je večja zaradi podaljšanega zadrževanja v tumorjih. Te lastnosti so posledica njihove kompleksnosti – tako na nivoju zgradbe kot mehanizmov za ciljno dostavo in ciljno sproščanje – ki se nenazadnje kaže v tehnoloških omejitvah. Te pa so eden od glavnih razlogov, da je danes za terapevtske namene registriranih le nekaj liposomskih pripravkov. Toda intenzivne raziskave so že prinesle obetaven napredek, ki ga dokazuje množica predkliničnih in kliničnih raziskav. Že v bližnji prihodnosti lahko zato na tržišču pričakujemo kar nekaj novih pripravkov iz liposomov.

6 Literatura

1. Bauer KH, Frömming KH, Führer C. Mikropartikeln, Nanopartikeln, Liposomen. In: Pharmazeutische Technologie, 5th ed. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1997: 354-360.
2. Lasic DD. Liposomes. In: Liposomes in Gene Delivery, Boca Raton: CRC Press LLC, 1997: 67-112.
3. Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv* 1995; 70: 95-111.
4. El Maghraby GMM, Williams AC, Barry BW. Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas. *Int J Pharm* 2005; 292: 179-185.
5. Torchillin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 145-160.
6. Mayer LD. Future developments in the selectivity of anticancer agents: Drug delivery and molecular strategies. *Cancer Metast Rev* 1998; 17: 211-218.
7. Andresen TL, Jensen SS, Jørgensen K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog Lipid Res* 2005; 44: 68-97.
8. Simões S, Moreira JN, Fonseca C et al. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 947-965.
9. Sapra P, Allen TM. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res* 2003; 42: 439-462.
10. Xiong XB, Huang Y, Lu WL et al. Enhanced intracellular delivery and improved antitumor efficacy of doxorubicin by sterically stabilized liposomes modified with a synthetic RGD mimetic. *J Control Release* 2005 (v tisku).
11. Marcucci F, Lefoulon F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug Disc Today* 2004; 9 (5): 219-228.
12. El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* 2004; 94: 1-14.
13. Zhdanov RI, Podobed OV, Vlassov VV. Cationic lipid-DNA complexes – lipoplexes – for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry* 2002; 58: 53-64.
14. Felnerova D, Viret JF, Glück R et al. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotech* 2004; 15: 518-529.
15. Kaneda Y. Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 43: 197-205.