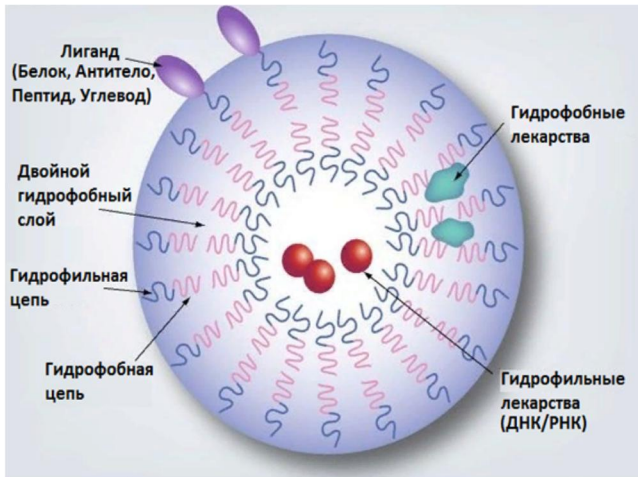




Санкт-Петербургский
государственный
университет
www.spbu.ru

«Полимеросомы: методы получения и использование в медицине»

Юдин Д.В.
Ефименко Н.И.
Острась А.С.



Преимущества:

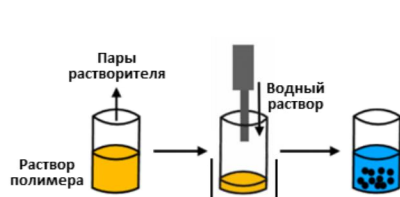
- Стабильность при хранении
- Чувствительность к различным типам внешнего воздействия
- Вариация толщины мембраны и ее проницаемости

2

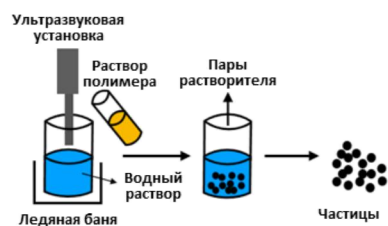
Самоорганизация амфифильных полимеров – один из удобных способов получения полимерных наночастиц. Одним из наиболее интересных видов самоорганизующихся наночастиц являются полые сферические частицы, или полимеросомы. Оболочка таких частиц формируется за счет самоорганизации в водных средах амфифильных блок-сополимеров и схожа с двойным фосфолипидным слоем липосом. Вариация химической природы исходных блоков амфифильного полимера дает возможность управлять как физико-химическими, так и биологическими свойствами формируемых полимерных частиц. В частности, наличие реакционноспособных групп в полимерных блоках позволит введение биофункциональных сигнальных молекул, способных к направленному взаимодействию с поверхностными лигандами интересующих клеток по принципу биологического распознавания, а также возможность конъюгации лекарственного вещества на поверхности полимеросомы. Полая структура частиц обеспечит инкапсулирование гидрофильных лекарственных соединений, а двойная гидрофобная мембрана позволяет инкапсулировать гидрофобные соединения, соответственно, высвобождающихся в процессе деградации полимеросом. В зависимости от природы сополимера полимеросомы обладают рядом преимуществ по сравнению с липосомами: стабильность при хранении, чувствительность к различным типам внешнего воздействия, вариация толщины мембраны и ее проницаемости.



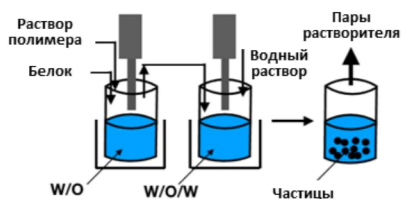
ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ



Регидратация тонких пленок



Техника «вытеснения» растворителя



Метод двойной эмульсии



Прямая гидратация

Y. He, L. Qin, Y. Huang, C. Ma, *Nanoscale Res. Lett.* **15** (2020); IF 3.159

3

Перейдем непосредственно к некоторым из методов получения полимеросом:

Регидратация тонких пленок

В технике регидратации тонких пленок, блок-сополимер добавляют к органическому растворителю с последующим его испарением. Полученная таким образом пленка впоследствии гидратируется путем добавления к ней водной фазы. При гидратации вода проникает через дефекты в слоях полимера, на поверхности пленки образуются выпуклости – будущие полимеросомы.

Распространена такая вариация метода дегидратации тонких пленок, как электроформирование. Вместо использования твердой поверхности амфифильную пленку наносят на пару электродов.

Техника вытеснения растворителя

Полимер растворяют в органическом растворителе, который может как смешиваться с водой, так и нет. Затем раствор полимера медленно смешивают с водной фазой при интенсивном перемешивании, а растворитель удаляется.

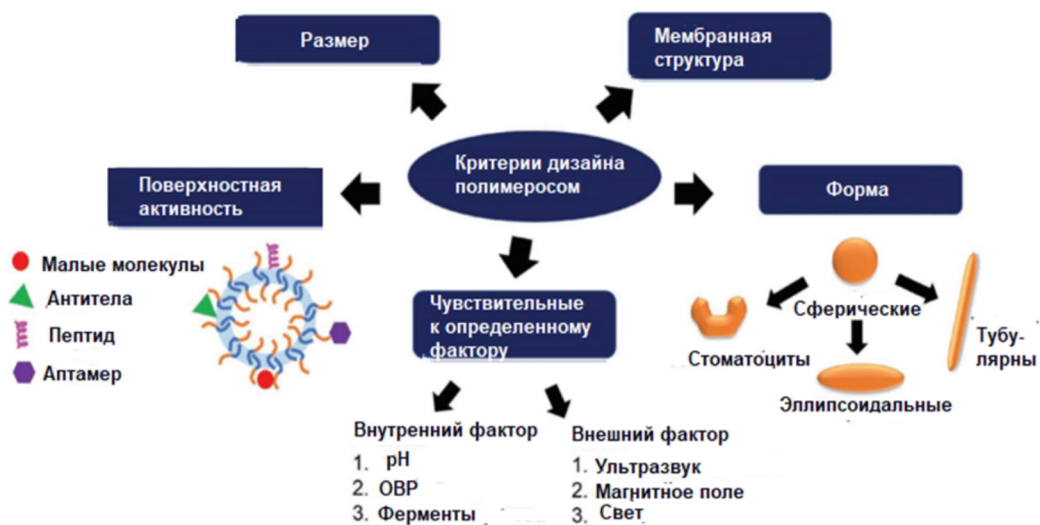
Метод двойной эмульсии

В рамках метода двойной эмульсии в раствор полимера в органическом, несмешивающемся с водой растворителе, вносят водный раствор инкапсулируемых компонентов. Полученную эмульсию «вода-в-масле» по каплям вносят в водный, часто буферный раствор. Затем органический растворитель удаляют.

Прямая гидратация

Некоторые полимеросомы образуются непосредственно в воде. Процесс прямой гидратации прост. Этот метод требует, чтобы сополимер мог растворяться в воде или буферном растворе.

Также существуют другие методы, однако основными являются перечисленные.

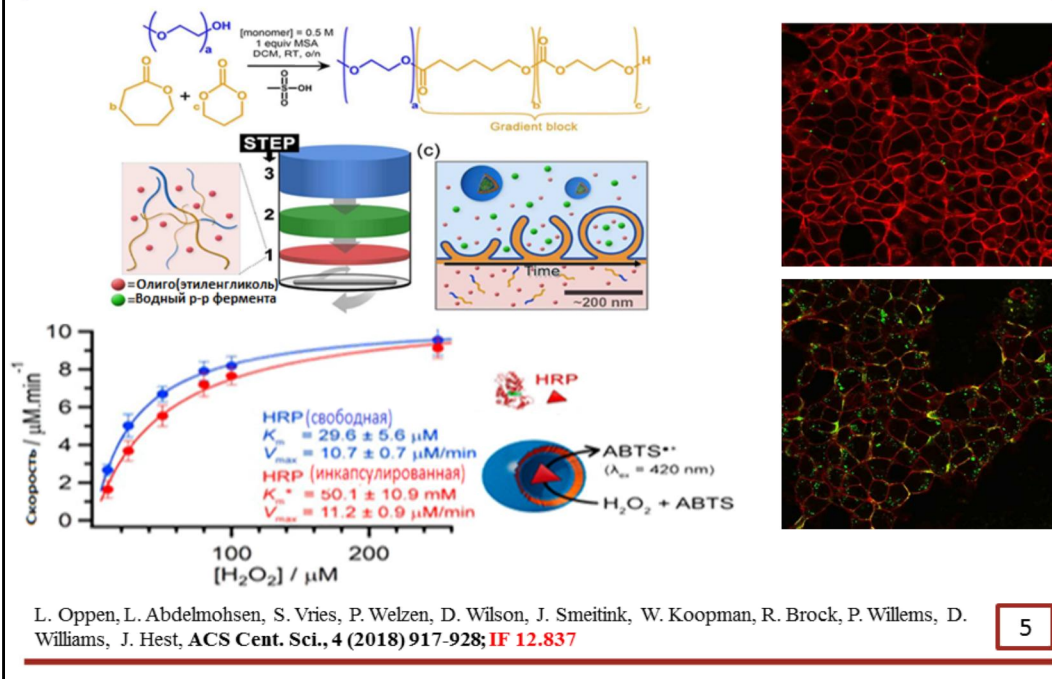


J. Leong, J. Y. Teo, V. K. Aakalu, Y. Y. Yang, H. Kong, *Adv Healthc Mater*, 7 (2018); IF 5.760

4

При проектировании полимеросом основными параметрами, обеспечивающими их эффективность, являются размер, структура мембраны, форма, поверхностная активность полимеросом и их чувствительность к внутренним и внешним стимулам.

Далее в рамках доклада будут рассмотрены различные варианты применения полимеросом в медицине и подходы в их проектировании в зависимости от поставленной задачи.



Биоразлагаемые полупроницаемые нанореакторы, которые способны к клеточной интеграции, могут функционировать как синтетические органеллы, тем самым представляя собой захватывающую терапевтическую технологию.

Авторы данной статьи представляют биоразлагаемые загруженные ферментами полимеросомы из блок-сополимера полиэтиленгликоля, поликапролактона и политриметиленкарбоната.

Методика получения полимеросом выглядела следующим образом: в раствор блок-сополимера в олигоэтиленгликоле вводили водный раствор ферментов при интенсивном перемешивании в течении 5 минут, а затем разбавляли до нужной концентрации.

Сообщается, что эти полимеросомы могут применяться в качестве антиоксидантных нанореакторов для борьбы с окислительным стрессом в клетке.

Для первичной оценки эффективности таких нанореакторов проводили инкапсулирование фермента пероксидазы хрена. Полученные наночастицы обрабатывались раствором субстрата для выбранного фермента в присутствии перекиси водорода. Продуктом окисления субстрата являлось окрашенное соединение, что позволило спектрофотометрически оценивать скорость реакции. Таким образом, были получены графики зависимости скоростей реакции от концентрации перекиси водорода. Красным обозначен профиль описанного эксперимента с инкапсулированной пероксидазой, а синим - профиль в случае

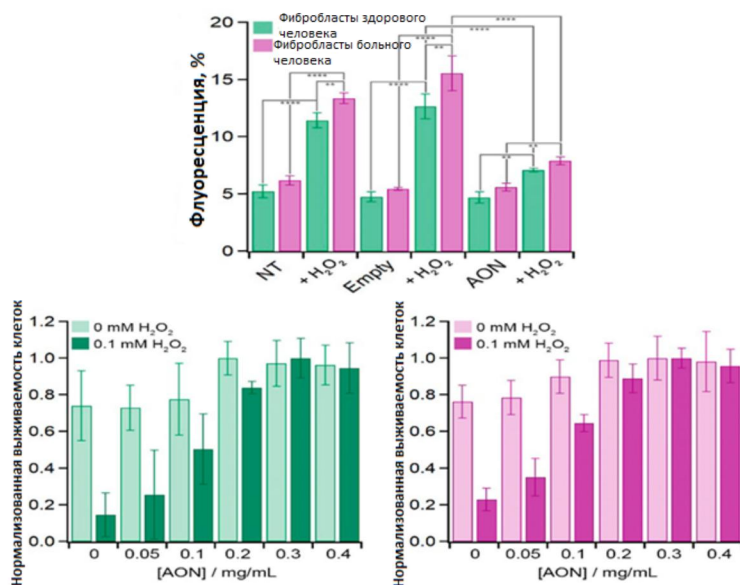
свободной пероксидазы хрена. Из графиков видно, что полученные полимеросомы обладают полупроницаемостью и могут быть использованы в качестве нанореакторов.

Эффективность поглощения клетками полимеросомных нанореакторов можно регулировать путем модификации их поверхности пептидами. Так, авторами было установлено, что для не модифицированных нанореакторов, поглощение практически отсутствовало, тогда как модифицированные пептидом полимеросомы легко проникали в клетки.

Иллюстрацией этому служит отсутствие флуоресценции в клетках при их обработке не модифицированным нанореактором, в противоположность модифицированному.



СИНТЕЗ ИСКУССТВЕННОЙ ОРГАНЕЛЛЫ



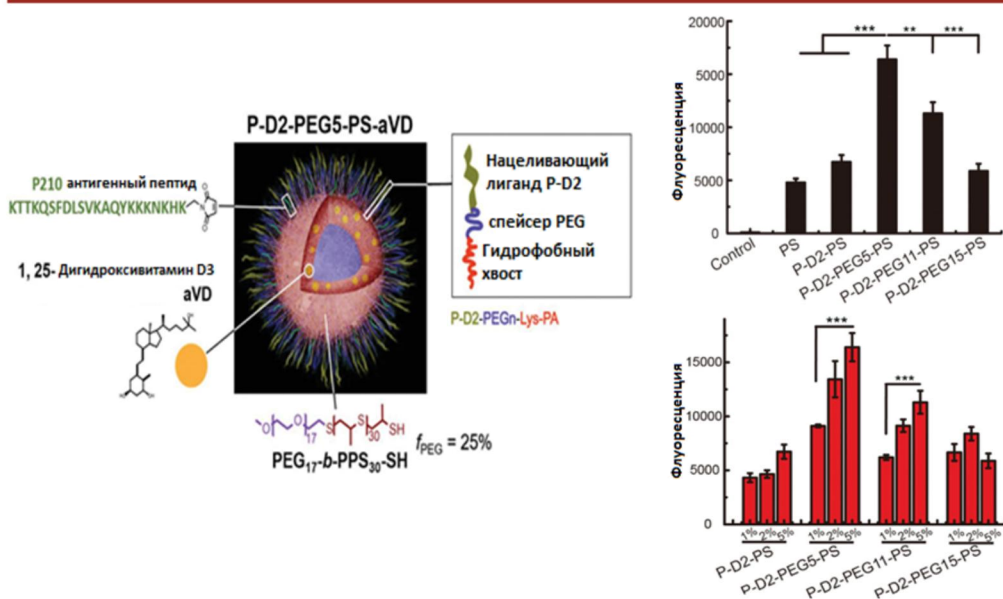
L. Oppen, L. Abdelmohsen, S. Vries, P. Welzen, D. Wilson, J. Smeitink, W. Koopman, R. Brock, P. Willems, D. Williams, J. Hest, *ACS Cent. Sci.*, 4 (2018) 917-928; **IF 12.837**

6

Оптимизировав условия клеточного поглощения, авторы провели оценку эффективности нанореакторов при инкапсулировании полимеросомы каталазой, важным ферментом для защиты клеток от окислительного повреждения.

Для этого исследователи использовали первичные фибробласты кожи здорового человека и пациента с повышенными значениями активных форм кислорода. Клетки обрабатывали дихлордигидрофлуоресцеином, который при окислении флуоресцирует. После обработки клеток перекисью водорода было установлено, что в клетках, содержащих нагруженные каталазой полимеросомы, наблюдалось подавление флуоресценции, чего не наблюдалось в случае с контрольными экспериментами, где в клетки не были введены полимеросомы или были введены пустые.

Оценка выживаемости фибробластов здорового и больного пациента в зависимости от концентрации нанореакторов показала полную выживаемость клеток при концентрации полимеросом 0,3 мг/мл.



S. Yi, X. Zhang, M. H. Sangji, Y. Liu, S. D. Allen, B. Xiao, S. Bobbala, C. L. Braverman, L. Cai, P. I. Hecker, M. DeBerge, E. B. Thor, R. E. Temel, S. I. Stupp, E. A. Scott, *Adv. Funct. Mater.*, 29 (2019); **IF 15.621**

7

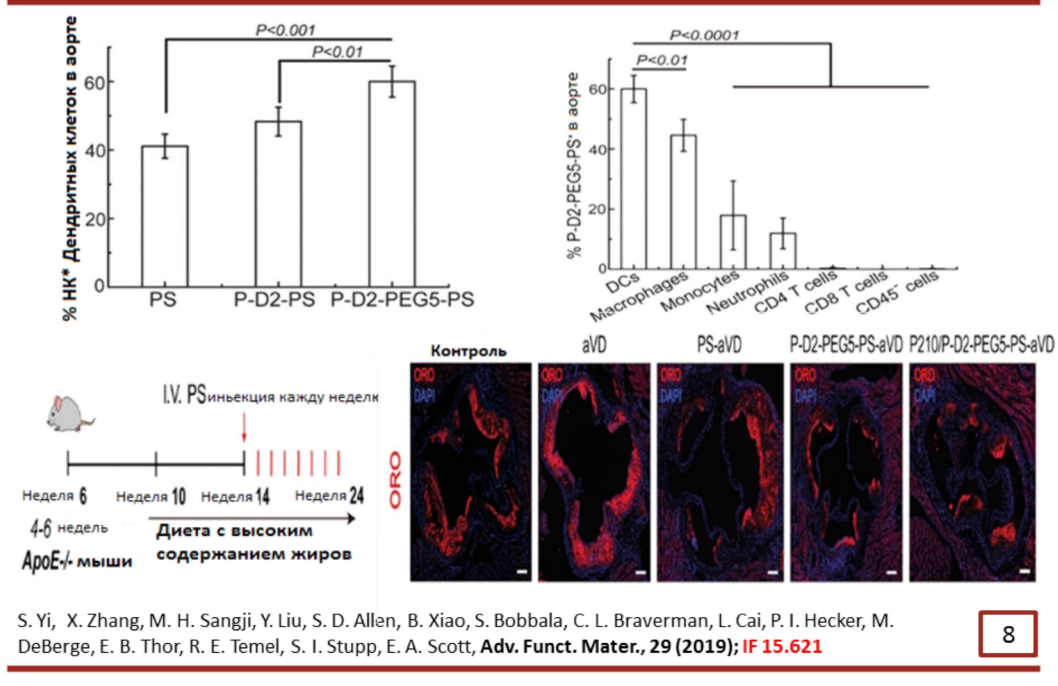
Основной причиной сердечно-сосудистых заболеваний является атеросклероз, характеризующийся поражениями стенок артериальных сосудов. Дендритные клетки принимают непосредственное участие в инициации воспалительного процесса и, впоследствии, разрастанию тканей гладких мышц сосудов, характеризующее атеросклероз. Поэтому, предпочтительной мишенью для иммуномодуляции воспаления служат именно дендритные клетки.

Авторы данной статьи предлагают использовать полимеросомы для доставки противовоспалительного агента 1,25-дигидроксивитамина D3 и антигенного пептида, модулирующих работу дендритных клеток. В качестве системы доставки были выбраны частицы, состоящие из блок-сополимера полиэтиленгликоля и полипропиленсульфида.

Сополимер с 1,25-дигидроксивитамином D3 растворяли в дихлорметане после чего растворитель был удален под вакуумом. Полученные тонкие пленки гидратировали натрий-фосфатным буфером с получением загруженных полимеросом.

Поверхность полученных полимеросом была модифицирована пептидной конструкцией, связывающейся со специфическим рецептором на поверхности дендритных клеток. При рассмотрении влияния структуры пептидной конструкции наблюдали зависимое от длины спейсера клеточное поглощение, лучшее значение было выявлено для спейсера из 5 звеньев PEG. Поглощение полимеросом дендритными клетками также повышалось с увеличением плотности пептидных

конструкций, авторы использовали молярные отношения пептида к сополимеру в 1%, 2% и 5%.



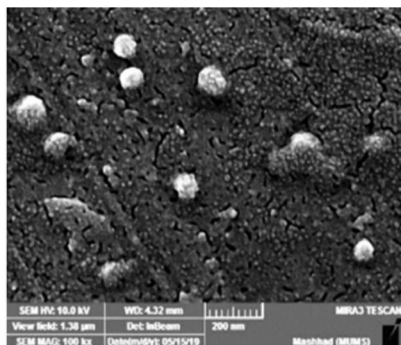
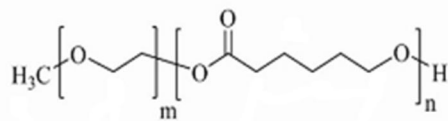
На данном слайде показаны графики оценки содержания полимеросом в дендритных клетках аорты спустя 24 часа после внутривенной инъекции и умерщвления мышей. Видно, что полимеросомы с оптимальной модификацией имеют больший процент проникновения в клетки. При этом они продемонстрировали заметно более высокую связь с дендритными клетками, чем с любой другой клеточной популяцией в аорте.

Для оценки терапевтического потенциала системы доставки 1,25-дигидроксивитамина D3 и антигенного пептида, самцам мышей в возрасте 8–10 недель обеспечивали диету с высоким содержанием жиров в течение 4 недель для выявления сосудистых поражений.

Затем мышам вводили внутривенно один раз в неделю один из четырех способов лечения:

- свободный 1,25-дигидроксивитамин D3;
- полимеросомы, нагруженные 1,25-дигидроксивитамин D3 без поверхностной модификации;
- полимеросомы, нагруженные 1,25-дигидроксивитамин D3 с пептидной конструкцией на поверхности
- с дополнительной модификацией антигенным пептидом.

После 8 недель введения мышей умерщвляли. В отличие от контрольных мышей, авторы наблюдали, что количество и размер атеросклеротических поражений, которые, в аорте были явно уменьшены в 3 и 4 варианте.



T. Zavvar, M. Babaei, K. Abnous, S. M. Taghdisi, S. Nekooei, M. Ramezani, M. Alibolandi, *Int. J. Pharm.*, (2020); IF = 3.4

9

Новым направлением в лечении рака является использование тераностических систем, позволяющих проводить эффективную терапию с одновременной диагностикой.

Авторами данной статьи была предложена тераностическая композиция, преимуществом которой являлось использование квантовых точек, состоящих из сульфидов цинка-меди-индия, допированные ионами гадолиния, в качестве контрастных агентов для высокочувствительного диагностирования. Противораковым агентом в композиции являлся доксорубин.

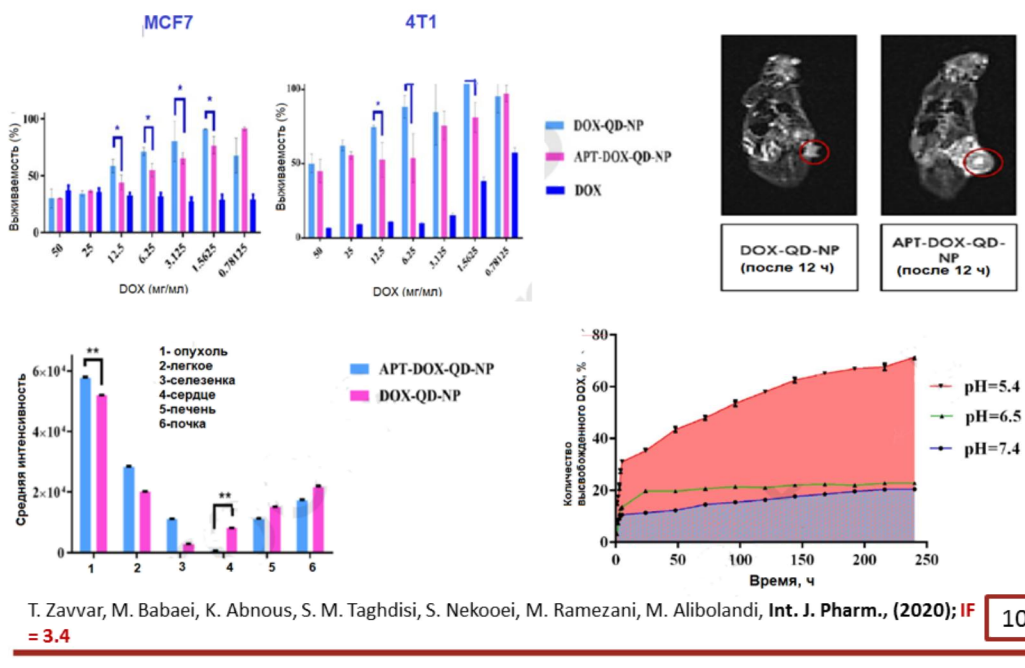
Для доставки были использованы полимеросомы, состоящие из сополимера полиэтиленгликоль–поликапролактон, поверхность которых была модифицирована аптамером ДНК для осуществления адресной доставки.

Для получения полимеросом использовали следующую методику: сополимер растворяли в смеси дихлорметан/ацетон и добавляли при обработке ультразвуком и охлаждении контрастный агент, затем эмульгировали с водным раствором гидрохлорида DOX. Полученную эмульсию медленно, при перемешивании, добавляли в раствор поливинилового спирта. Сначала 5%, а затем 0,1%. Через несколько часов полимеросомы центрифугировались и промывались водой для удаления ПВС. Модифицирование поверхности полимеросом аптамером осуществлялось путем выдерживания наночастиц в растворе NaCl с аминопроизводным аптамера в течение суток.

На слайде представлена морфология загруженных полимеросом, полученная методом сканирующей электронной микроскопии, а также продемонстрирована способность данных частиц излучать в ближней инфракрасной области.



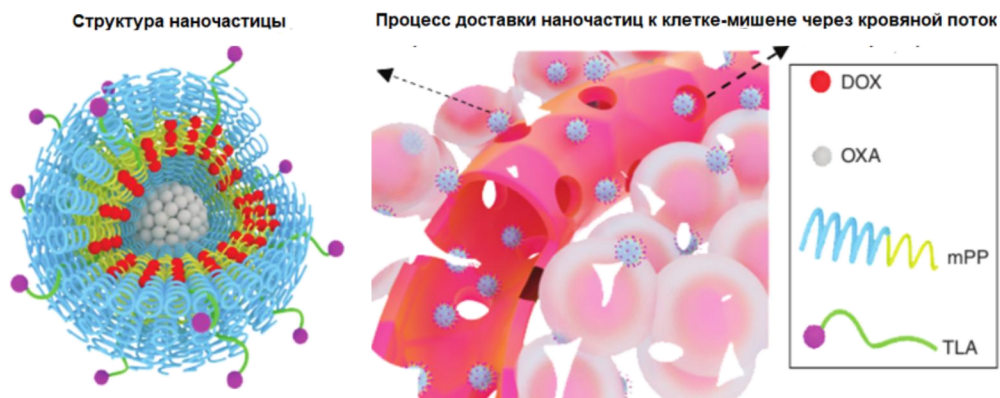
ПОЛИМЕРОСОМЫ С КВАНТОВЫМИ ТОЧКАМИ: ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ



Проведенные измерения цитотоксичности показали, что полимеросомы с аптамером обладают более сильным цитотоксическим эффектом, по сравнению с немодифицированной полимеросомой. А низкая цитотоксичность данных наночастиц по сравнению со свободным доxorубицином авторами объяснено стабильностью полимеросомы.

Для характеристики биораспределения полученных тераностических систем были проведена магнитно-резонансная томография, результаты которой показывают высокую степень концентрации наночастиц с аптамером в опухолевых клетках, даже по прошествии суток после введения наночастиц, благодаря взаимодействию аптамера с клетками опухоли по типу лиганд-рецептор. Если рассмотреть диаграмму распределения интенсивностей флуоресценции, то тоже видна сильная аккумуляция полимеросом с аптамером, что приводит к увеличению интенсивности сигнала.

Авторы также изучили эффективность высвобождения доксорубицина в зависимости от рН среды. Показано, что при понижении кислотности от 7.4 до 5.4 данный параметр увеличивался, что можно объяснить гидролизом полимерных блоков и распадом полимеросом. Это удобно, поскольку такие системы высвобождают препарат внутри клеток опухолей (рН=5.4-6.5), оставаясь практически неизменными в кровяном потоке (рН=7.4).



Tengfei Liu, Yudi Deng, Jianxu Yao, Hui Xiong, Jing Yao, *Nanomedicine*, 14 (2019); IF=4.7

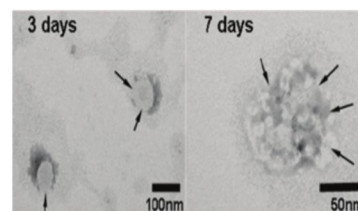
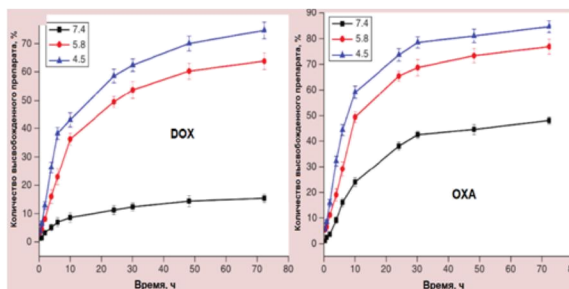
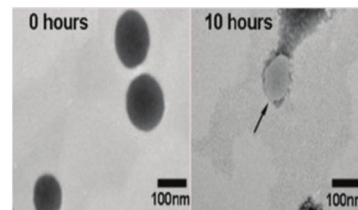
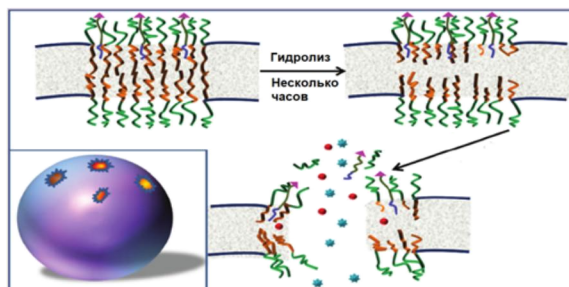
11

Еще одной актуальной задачей является создание препаратов для терапии мультирезистентных видов рака, где необходимым является одновременное применение сразу нескольких противоопухолевых препаратов.

Авторы статьи предложили использовать для лечения гепатоцеллюлярной карциномы. одновременно инкапсулированные доксорубицин и оксалилплатин в полимеросомы.

Для получения данных полимеросом авторы смешали следующие растворы: сополимер метил-(полиэтиленгликоль) полилактид и доксорубицин в дихлорметане с конъюгатом TPGS -лактобионовой кислоты в ацетоне, после чего органические растворители были удалены, и добавлен водный раствор оксалилплатина при интенсивном перемешивании.

Сообщается, что доставка осуществлялась посредством эффекта повышенной проницаемости раковых клеток.



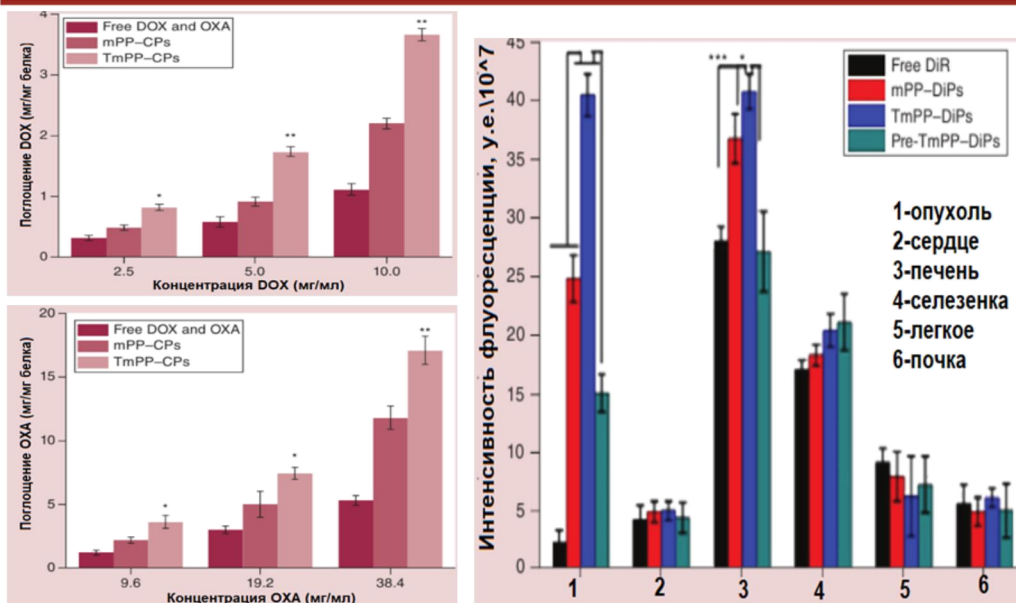
Tengfei Liu, Yudi Deng, Jianxu Yao, Hui Xiong, Jing Yao, *Nanomedicine*, 14 (2019); IF=4.7

12

На представленном слайде наглядно продемонстрировано действие наночастиц при попадании в целевую клетку. Такая система доставки обладает устойчивостью в среде крови (pH=7.4), при этом эффективно высвобождая лекарство посредством гидролиза полиэфиров мембраны при пониженных значениях pH опухолевых тканей, что мы также можем наблюдать на снимках ПЭМ, которые демонстрируют деградацию полимеросом во времени при pH=4.5.



РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ И ПОЛИМЕРОСОМ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ



Tengfei Liu, Yudi Deng, Jianxu Yao, Hui Xiong, Jing Yao, *Nanomedicine*, 14 (2019); IF=4.7

13

Для характеристики эффективности проникновения таких систем, были получены профили внутриклеточного поглощения доксорубина и оксалилплатина, в зависимости от типа полимеросом и в случае свободных препаратов. Как можно увидеть, в случае использования полимеросом, поверхностно модифицированных TPGS-лактобионовой кислотой, поглощение протекает эффективнее всего, о чем также свидетельствует график анализа флуоресцентных сигналов из образцов тканей, пораженных опухолью.



В ходе данного доклада были рассмотрены основные способы получения полимеросом, а также варианты их медицинского применения, таких как:

- Потенциальное использование полимеросомы в качестве искусственной органеллы в борьбе с окислительным стрессом в клетках
- Разработка системы для лечения хронического сердечно-сосудистого заболевания (атеросклероза)
- Использование полимеросом, инкапсулированных квантовыми точками, в качестве контрастных противоопухолевых препаратов и применение полимеросом в комбинированной противоопухолевой химиотерапии



1. Y. He, L. Qin, Y. Huang, C. Ma, **Nanoscale Res. Lett**, **15** (2020); **IF 3.159**
2. J. Leong, J. Y. Teo, V. K. Aakalu, Y. Y. Yang, H. Kong, **Adv Healthc Mater**, **7** (2018); **IF 5.760**
3. L. Oppen, L. Abdelmohsen, S. Vries, P. Welzen, D. Wilson, J. Smeitink, W. Koopman, R. Brock, P. Willems, D. Williams, J. Hest, **ACS Cent. Sci.**, **4** (2018) **917-928**; **IF 12.837**
4. S. Yi, X. Zhang, M. H. Sangji, Y. Liu, S. D. Allen, B. Xiao, S. Bobbala, C. L. Braverman, L. Cai, P. I. Hecker, M. DeBerge, E. B. Thor, R. E. Temel, S. I. Stupp, E. A. Scott, **Adv. Funct. Mater.**, **29** (2019); **IF 15.621**
5. T. Zavvar, M. Babaei, K. Abnous, S. M. Taghdisi, S. Nekooei, M. Ramezani, M. Alibolandi, **Int. J. Pharm.**, (2020); **IF = 3.4**
6. Tengfei Liu, Yudi Deng, Jianxu Yao, Hui Xiong, Jing Yao, **Nanomedicine**, **14** (2019); **IF=4.7**

