



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE POVRCHOVĚ MODIFIKOVANÝCH NANOLIPOSOMŮ S VYUŽITÍM TECHNIK KLIK CHEMIE

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SURFACE-MODIFIED NANOLIPOSOMES USING CLICK CHEMISTRY
TECHNIQUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Aneta Frydrychová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1636/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Aneta Frydrychová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.**

Název diplomové práce:

Příprava a charakterizace povrchově modifikovaných nanoliposomů s využitím technik klik chemie

Zadání diplomové práce:

1. Příprava nanoliposomů technikou mikrofluidizace a vysokotlaké extruze
2. Povrchová modifikace nanoliposomů biokompatibilními polymery s využitím metod klik chemie a charakterizace liposomálních nosičů pomocí moderních fyzikálně–chemických metod: dynamický rozptyl světla, gelová permeační chromatografie, nano flow–cytometrie, infračervené spektroskopie
3. Studium interakce povrchově modifikovaných liposomů s buněčnými kulturami in vitro (dendritické buňky, THP–1, plicní a kolorektální nádorové linie A549, CT26.WT)

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Aneta Frydrychová
studentka

prof. RNDr. Jaroslav Turánek,
CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Liposomy jsou již desítky let intenzivně zkoumány pro své unikátní vlastnosti, díky kterým jsou použitelné například jako systémy pro cílené doručování léčiv či ke konstrukci vakcín. Tato diplomová práce přináší přehled o jejich nejdůležitějších vlastnostech, možnostech přípravy a modifikacích. Cílem práce je pak samotná příprava, charakterizace a následná povrchová modifikace nanoliposomů. Liposomy byly připraveny metodou hydratace lipidového filmu, pro povrchovou modifikaci byl použit polysacharid manan. Díky využití lipidu s N-oxy skupinou probíhala modifikace přes oximovou vazbu prostřednictvím klik chemie. Nanoliposomy byly charakterizovány řadou fyzikálně-chemických metod jako je TEM, DLS, FT-IR či nano-průtoková cytometrie. Součástí práce je také studium interakce liposomů s vybranými buněčnými liniemi pro ověření, zda stimulují cesty imunitní odpovědi. Výsledky této studie potvrzují aktivaci inflammasomu NLRP3 vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů (IL-1 β). Připravené liposomy jsou tedy potenciálně použitelné jako adjuvans vakcín.

ABSTRACT

Over the past decades the liposomes have been intensively studied for their unique properties which predispose them for use as drug delivery systems or for constructions of vaccines. This diploma thesis provides an overview of their most important properties, preparation options and their surface modification. The aim of this thesis is thus a preparation and characterization of the nanoliposomes and their surface modification. The liposomes were prepared by lipid film hydration method and mannan polysaccharide was used for surface modification. Due to the use of a lipid with an N-oxy group, the modification was carried out via an oxime ligation via click chemistry. Nanoliposomes were characterized by series of physicochemical methods such as TEM, DLS, FT-IR or nano-flow cytometry. Part of the thesis is a study of the interactions of liposomes accomplished on selected cell lines to verify whether they stimulate immune response pathways. Its results confirmed activation of the NLRP3 inflammasome leading to the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β). Thus, these polymer coated nanoliposomes are potentially useful as vaccine adjuvants.

KLÍČOVÁ SLOVA

nanoliposomy, manan, povrchová modifikace, klik chemie, aminoxy ligace, vakcíny, adjuvans, reportérová buněčná linie, inflammasom

KEY WORDS

nanoliposomes, mannan, surface modification, click chemistry, aminoxy ligation, vaccines, adjuvant, reporter cell culture, inflammasome

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

FRYDRYCHOVÁ, Aneta. *Příprava a charakterizace povrchově modifikovaných nanoliposomů s využitím technik klik chemie* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/140793>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jaroslav Turánek.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou řádně citovány.

.....

Aneta Frydrychová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu této diplomové práce prof. RNDr. Jaroslavu Turánkovi, CSc., DSc. za vedení a možnost jejího vypracování v laboratořích firmy Nexars. Dále a především děkuji Mgr. Elišce Bartheldyové, Ph.D. za veškerou pomoc s experimenty a za všechny čas, který mi věnovala. Také bych chtěla moc poděkovat MVDr. Pavlíně Turánek Knötigové, Ph.D. za pomoc s experimenty na buňkách a jejich vyhodnocením a Ing. Nikole Odehnalové za měření na nano-průtokové cytometrii.

Poděkování posílám i mojí rodině za obrovskou podporu (nejen) během celého studia.

OBSAH

ÚVOD	7
TEORETICKÁ ČÁST	8
1 NANOLIPOSOMY	9
1.1 Příprava nanoliposomů	12
1.1.1 Hydratace lipidového filmu	14
1.1.2 Vysokotlaká extruze	15
1.2 Metody charakterizace	17
1.2.1 Dynamický rozptyl světla (DLS)	17
1.2.2 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR)	18
1.2.3 Nano-průtoková cytometrie	20
1.3 Modifikace liposomů	21
1.3.1 Manan	22
1.3.2 Klik chemie	24
1.4 Využití v medicíně	26
1.4.1 Liposomy a léčba rakoviny	26
1.4.2 Liposomy a teranostika	28
1.4.3 Liposomy a vakcíny	30
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
2 CÍLE PRÁCE	35
3 MATERIÁLY A METODY	36
3.1 Materiály	36
3.1.1 Chemikálie	36
3.1.2 Přístroje	36
3.1.3 Biologický materiál	37
3.2 Metody	37
3.2.1 Syntéza a povrchová modifikace liposomů	37
3.2.2 DLS měření	39
3.2.3 FT-IR spektrometrie	39
3.2.4 Nano-průtoková cytometrie	39
3.2.5 Kultivační podmínky a pasážování	39
3.2.6 Aktivace inflamasomu NLRP3	40

4	VÝSLEDKY A DISKUZE	44
4.1	Fyzikálně-chemická charakterizace částic	44
4.1.1	Transmisní elektronová mikroskopie	44
4.1.2	DLS analýza	45
4.1.3	Nano-průtoková cytometrie	49
4.1.4	FT-IR analýza	51
4.2	Výsledky biologických testů	53
4.2.1	Aktivace inflamasomu NLRP3	53
5	ZÁVĚR	56
	REFERENCE	57

ÚVOD

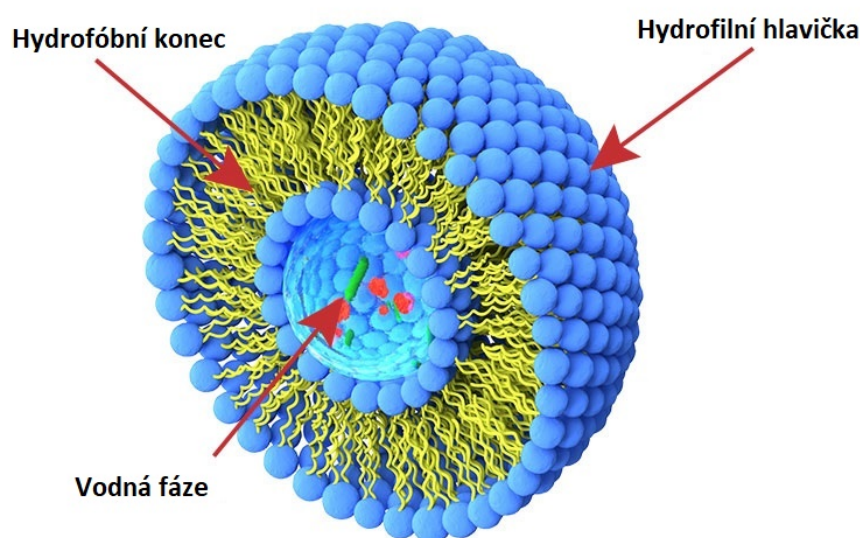
Vakcíny na COVID-19 byly vyvinuty nebyvalou rychlostí, což by nebylo možné bez desítek let výzkumu v oblasti nanotechnologií a s tím spojeného doručování různých molekul od chemoterapeutik přes vitamíny a enzymy k nukleovým kyselinám. Nanomateriálové nosiče mají obrovskou plochu povrchu a lze je snadno modifikovat tak, aby zapouzdřily velké množství léčiva, zvyšovaly akumulaci léčiv v nádorech prostřednictvím efektu zvýšené permeability a retence (EPR) či díky selektivnímu cílení na nádorové buňky. Nanonosiče také zlepšují rozpustnost, biologickou dostupnost a farmakokinetické vlastnosti chemoterapeutik.¹ V této oblasti jsou za průkopníky považovány nanočástice na bázi lipidů. Liposomy byly také první nano-platformou pro doručování léčiv, která úspěšně přešla od konceptu ke klinické aplikaci; příkladem je Doxil, první nanonosičový systém s doxorubicinem používaný k léčbě rakoviny prsu, vaječníků a dalších solidních nádorů, který byl schválen FDA v roce 1995. Od té doby byla schválena velká řada produktů na bázi nanočástic pro klinické použití včetně vakcín od firem Moderna či BioNTech/Pfizer, které také využívají vlastností liposomů.

Liposomy, vezikuly fosfolipidové dvojvrstvy, mohou enkapsulovat jak hydrofilní, tak i lipofilní léčiva a chránit je před degradací. Liposomy jsou od svého objevení v roce 1961 intenzivně studovány a stále tvoří zajímavou oblast výzkumu. A právě o jejich vlastnostech, možnostech přípravy a využití v oblasti medicíny bude pojednávat tato diplomová práce. V experimentální části se pak zaměřím na samotnou přípravu, povrchovou modifikaci a charakterizaci nanoliposomů; jejich interakci *in vitro* pak budu zkoumat na vybraných buněčných liniích.

TEORETICKÁ ČÁST

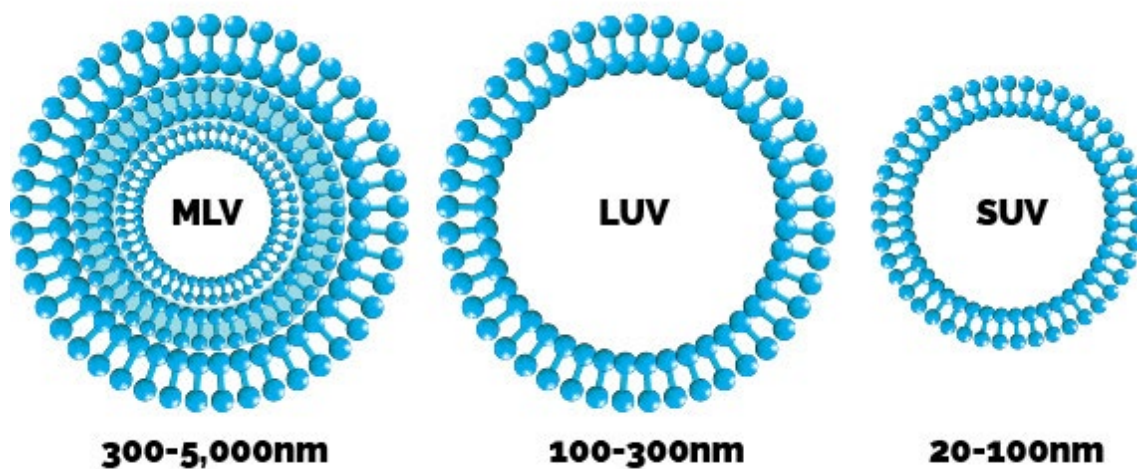
1 NANOLIPOSOMY

Liposomy můžeme definovat jako sférické vezikuly složené z biodegradabilních přírodních nebo syntetických fosfolipidů. Fosfolipidy jsou amfipatické molekuly – mají jak lipofilní, tak i hydrofilní část. Polární hlavičky se orientují směrem k vodné fázi, zatímco hydrofobní konce tvoří vnitřní oblast membrány a tvoří tak dvojvrstvu. Struktura liposomu je znázorněna na Obr. 1. Právě takové složení umožňuje liposomům zapouzdřit do hydrofilní složky ve vodě rozpustné komponenty a ty rozpustné v tucích zase do složky lipofilní. Této vlastnosti se využívá ke zlepšení farmakodynamického profilu léčiv, vitamínů i enzymů, a proto jsou liposomy zkoumány jako nosičový systém ke zvýšení účinnosti léčiv zvýšením rozpustnosti, zlepšením biologické dostupnosti, změnou farmakokinetiky a zlepšením stability *in vitro* a *in vivo*. Liposomální nosičové systémy mohou také zvýšit terapeutickou účinnost léčiva jeho cíleným doručením na místo použití a udržováním minimální efektivních dávek po delší čas. ²



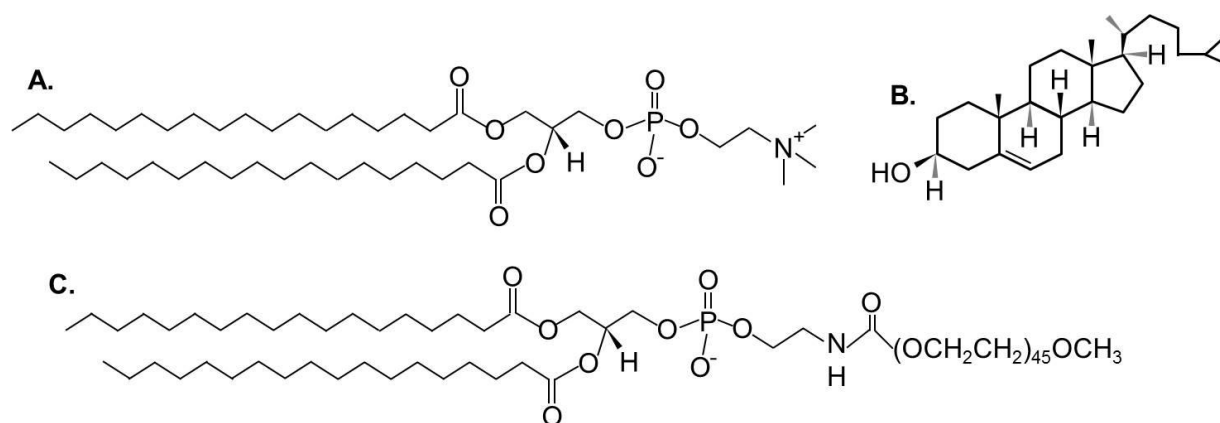
Obr. 1 Struktura liposomu. Dostupné z <https://www.inprocess-lsp.com/liposomes>, upraveno.

Velikost liposomů se může pohybovat od velmi malých 0,025 μm až po velké 10 μm vezikuly (gigantické liposomy). Samotná velikost je jedním z limitujících omezení, které určuje poločas cirkulace liposomu v těle a společně s počtem lipidových dvojvrstev ovlivňuje i množství léčiva, které může být do liposomu enkapsulováno. Na základě jejich velikosti a počtu dvojvrstev, můžeme liposomy rozdělit do dvou kategorií, a to na multilamelární (MLV) a unilamelární vezikuly (UV). Unilamelární liposomy mohou být rozděleny na další 2 kategorie: velké (LUV) a malé (SUV). Unilamelární vezikuly mají jen jednu fosfolipidovou dvojvrstvu obklopující vodnou fázi, multilamelární liposomy jsou vezikuly s cibulovou strukturou – uvnitř liposomu se vytvoří několik jednodamelárních vezikul, čímž vznikne multilamelární struktura s koncentrickými fosfolipidovými vrstvami oddělenými vrstvami vody. Klasifikace liposomů je schematicky vyobrazena na Obr. 2.³



Obr. 2 Klasifikace liposomů na základě jejich velikosti a počtu dvojvrstev. Dostupné z <https://integratedhealthblog.com/recent-advances-liposomes-technology/>.

Hlavními chemickými složkami nanoliposomů jsou fosfolipidové molekuly. Jak je již napsáno výše, fosfolipidy jsou amfifilní molekuly, hlavička je hydrofilní a její acylový řetězec je hydrofobní. Přírodní fosfolipidy, zdrojem jsou vaječné žloutky nebo sója, obsahují značné množství polynenasycených mastných kyselin, díky čemuž jsou méně chemicky stabilní než syntetické ekvivalenty.⁴ Nejběžnější fosfolipidovou složkou liposomů je 2-distearoyl-sn-glycerofosfocholin (DSPC). Chemická struktura DSPC je na Obr. 3A. Tato molekula se skládá z polární fosfátové hlavní skupiny, která tvoří vnější část a hydrofobního uhlovodíkového řetězce, který tvoří vnitřek liposomové dvojvrstvy. Hlavovou část lze modifikovat pomocí funkčních skupin. Jako příklad funkcionalizovaného fosfolipidu, který se používá k připojování jiných polymerů (např. polyethylenglykolu PEG) je 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin (DSPE) (Obr. 3C).⁵ Typ, molární procento zastoupení (55-100 %) a orientace fosfolipidu určuje konečný tvar i velikost liposomu. Orientaci fosfolipidů ve dvojvrstvě ovlivňuje délka lipidové molekuly a velikost hlavní skupiny.⁴



Obr. 3 Chemické struktury nejběžnějších liposomálních komponentů. (A) DSPC, (B) cholesterol, (C) DSPE-PEG. Převzato z Himanshu Pandey et al.⁶

Důležitým kritériem pro výběr fosfolipidu k přípravě liposomu je také teplota fázového přechodu (T_c). Tato teplota T_c je definována jako teplota, při které lipid přechází z uspořádané fáze acylových řetězců na neuspořádanou strukturu dvojvrstvy tzv. tekutého krystalu. Konverze fází závisí na délce uhlovodíkových řetězců, stupni nasycení, náboji a druhu hlavní skupiny.⁷

Kromě lipidů či fosfolipidů mohou nanoliposomy obsahovat ve své struktuře další molekuly jako například steroly. Zabudování sterolů do liposomové dvojvrstvy může významně ovlivnit vlastnosti celé vezikuly. Nejpoužívanějším steroidem při přípravě takových lipidových vezikul je cholesterol (Obr. 3B). Cholesterol sám o sobě dvojvrstvu nevytváří, ale může být do ní zabudován ve vysokých koncentracích (například v molárním poměru cholesterolu k fosfolipidu až 1:1 či dokonce 2:1).⁸ Množství použitého cholesterolu závisí na předpokládané aplikaci. Používá se zejména ke zlepšení stability vezikul; tím, že brání krystalizaci fosfolipidů, moduluje tekutost a elasticitu dvojvrstvy.

1.1 Příprava nanoliposomů

Liposomy mají díky své velikosti a vlastnosti možné cílené distribuce široké využití v medicíně, farmaceutickém průmyslu, nutraceutikách či ve funkčních potravinách.⁹ Využívají se například jako nanočásticové nosiče léčiv – cytostatik, antibiotik nebo třeba anestetických látek.¹⁰ Pro takové aplikace však hraje zásadní roli samotná příprava nanoliposomů. Ideální metoda přípravy splňuje tři základní parametry: efektivní zachycení léčiva, úzkou velikostní distribuci a dlouhodobou stabilitu těchto liposomálních produktů. Všechny metody přípravy nanoliposomů zahrnují hydrataci lipidu, dimenzování částic a odstranění nezapouzdřeného léčiva.

Na velikost, lamelaritu i stabilitu nanoliposomů má vliv nejen metoda přípravy, ale také druh použitého organického rozpouštědla či fosfolipidů.¹¹ Nejběžněji používanými metodami jsou

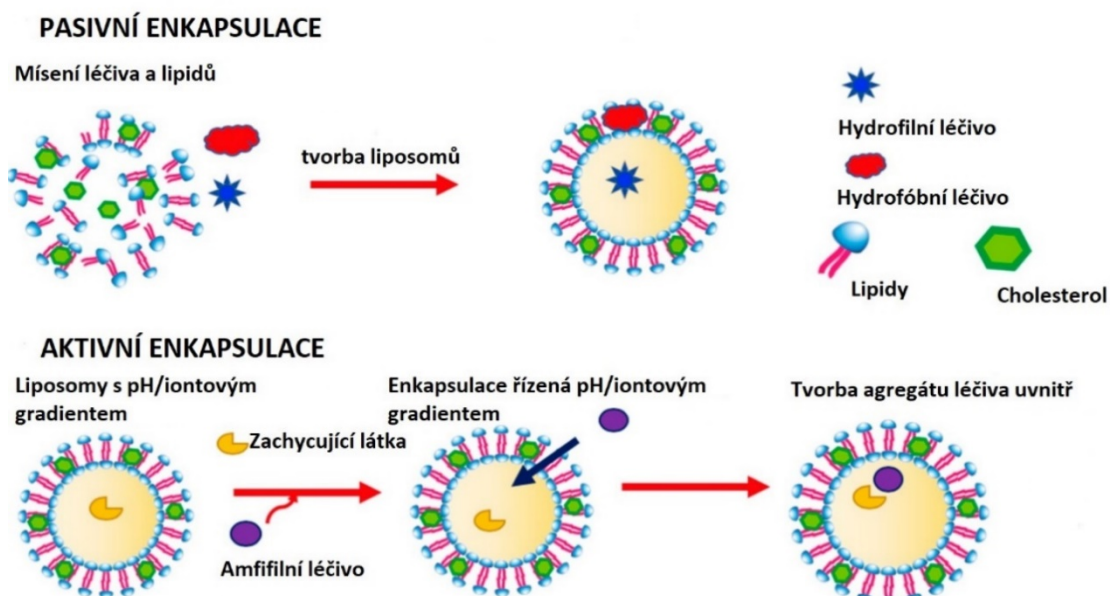
hydratace tenkého lipidního filmu, mikroemulzifikace, sonikace, membránová extruze, metoda vstříkávání etheru či ethanolu do vodného roztoku, mikrofluidizace a mikrofluidní mísení, metoda odpařování reverzní fáze, metoda dehydratace/hydratace a zamrazení/rozmrazení liposomů.¹² Na Obr. 4 jsou shrnuty hlavní výhody a nevýhody těchto metod. Dále jsou ve výčtu podrobněji popsány metody, které byly použity v experimentální části práce.

Metoda	Výhody	Nevýhody
Hydratace tenkého filmu	Vysoká rozpustnost přísad v počáteční fázi procesu	Použití toxických rozpouštědel, časově náročné, obtížné v měřítku
Vstříkování etheru/ethanolu	Jednoduchý postup	Zbytky organických rozpouštědel, zablokování trysek v etherovém systému, časově náročné, problém se sterilizací
Odpařování reverzní fáze	Jednoduché, přijatelná účinnost enkapsulace	Nevhodné pro enkapsulaci citlivých materiálů kvůli velkému objemu organických rozpouštědel, časově náročné, problém se sterilizací
Mikrofluidizace	Řízení velikosti částic, výroba velkého objemu kontinuálním a reprodukovatelným způsobem	Použití vysokých tlaků (až 10 000 psi)
Superkritický fluidní proces (SFP)	Řízení velikosti částic, možnost sterilizace in-situ, nízká spotřeba organického rozpouštědla	Vysoké náklady, nízký výtěžek, vysoký tlak až 350 bar
Dualní asymetrická centrifugace	Jednoduchá metoda, výtěžek produktů s úzkou distribucí velikosti, vysoká účinnost enkapsulace	Nevhodné pro hromadnou výrobu, vysoký tlak
Sonikace	Jednoduchá a rychlá metoda	Přehřátí vzorku způsobuje degradaci, špičky sonikátoru uvolňují kovové částice do produktu
Tepelné metody	Bez organických rozpouštědel	Nutnost vysokých teplot

Obr. 4 Hlavní výhody a nevýhody nejběžněji používaných metod přípravy liposomů. Upraveno podle Ali Zarrabi et al.¹³

K enkapsulaci léčiva do nanoliposomů vedou dva hlavní typy metod: pasivní a aktivní zapouzdření. Schéma obou typů enkapsulace znázorňuje Obr. 5. V případě metod pasivního nanášení je léčivo zapouzdřeno před nebo v určité fázi během přípravy liposomů, a to zavedením vodné fáze ve vodě rozpustného léčiva nebo organické fáze léčiva rozpustného v tucích. Vysoké účinnosti enkapsulace léčiva lze docílit použitím léků rozpustných v tucích, které mají vysokou afinitu k lipidové membráně nanoliposomu. U metody aktivního zavádění

mohou být léčiva zapouzdřena do nanoliposomů vytvořením difúzních gradientů pro ionty nebo léčiva napříč vnější a vnitřní vodnou fází.¹⁴ Tato metoda umožňuje dosahovat enkapsulační účinnost přes 90 %. Přípravuje se tak například liposomální doxorubicin.



Obr. 5 Schematické znázornění pasivní (nahore) a aktivní (dole) enkapsulace léčiva do liposomu.

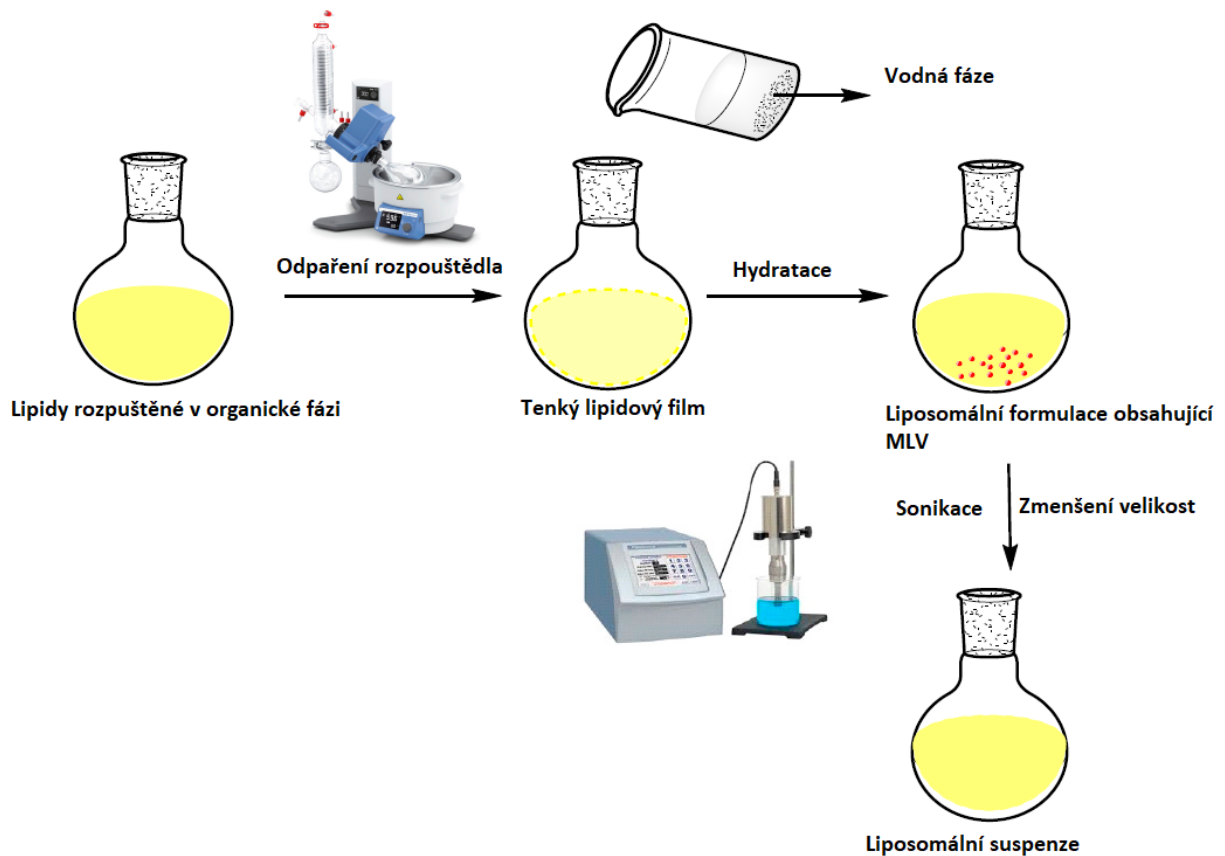
Upraveno podle Griffin Pauli et al.¹⁵

1.1.1 Hydratace lipidového filmu

Hydratace tenkého filmu je nejběžnější, jednoduchá metoda pro přípravu MLV rozpuštěním fosfolipidů v organických rozpouštědlech jako je dichlormetan, chloroform, etanol nebo směs chloroformu a metanolu (2:1, 9:1, 3:1 v/v)¹⁶; metoda je znázorněna na Obr. 6.

Tenký lipidový film se vytvoří odpařením rozpouštědla pod vakuem při teplotě 45-60 °C. V hydratačním kroku se používá destilovaná voda, fosfátový pufr či fyziologický roztok. Pro dosažení úplné hydratace lipidů se liposomální suspenze ponechává přes noc při 4 °C.¹⁷

Metoda hydratace tenkého filmu může být použita pro všechny různé druhy lipidových směsí. Její hlavní nevýhodou je však nízká enkapsulace a heterogenní distribuce připravených liposomů.¹⁸



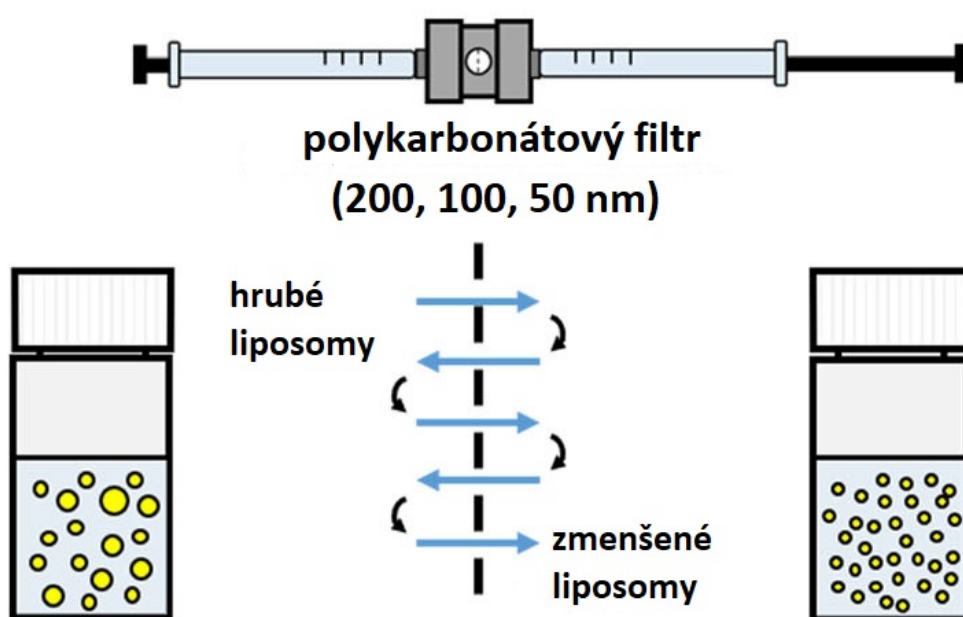
Obr. 6 Proces přípravy liposomů metodou hydratace lipidového filmu. Upraveno podle Prashant Kesharwani *et al.*¹⁹

1.1.2 Vysokotlaká extruze

Extruze je technika, při které se suspenze liposomů vede pod tlakem přes membránový polykarbonátový filtr o definované velikosti pórů (Obr. 7). Vezikuly lze extrudovat přes 0,2 μm membrány, což už umožňuje produkci sterilního přípravku pro *in vivo* injekce. Extruze je snadno reprodukovatelná, nezavádí nečistoty do vezikul a neindukuje rozklad fosfolipidů.²⁰

Metodou extruze se připravují liposomy s homogenní a kontrolovanou průměrnou velikostí bez jakýchkoli kontaminací. Různé parametry procesu extruze (aplikovaný tlak, počet opakovaných cyklů a velikost pórů filtrů) ovlivňují střední průměr i polydisperzitu produkovaných liposomů.²¹ V porovnání s ostatními metodami, které redukují velikost liposomů, je extruze nejefektivnější, zmenšující velikost liposomů o 67,9 %. Technikou extruze se také produkují nejmenší a nejvíce homogenní liposomy.²²

Hlavní nevýhodou této metody je však dlouhá příprava – před samotnou extruzí je potřeba mít již předem vytvořené liposomy (např. mikrometrické MLV, které se dále strukturně modifikují na nanoliposomy).²³



Obr. 7 Extruze liposomů přes polykarbonátový filtr. Upraveno podle Amrita Dikpati et al.²⁴

1.2 Metody charakterizace

Biologické chování nanoliposomů je ovlivněno velikostí, tvarem, mikrostrukturou, polydisperzitou, ale i povrchem. K určení těchto parametrů existuje celá řada fyzikálně-chemických metod, nejběžnější z nich shrnuje Obr. 8.

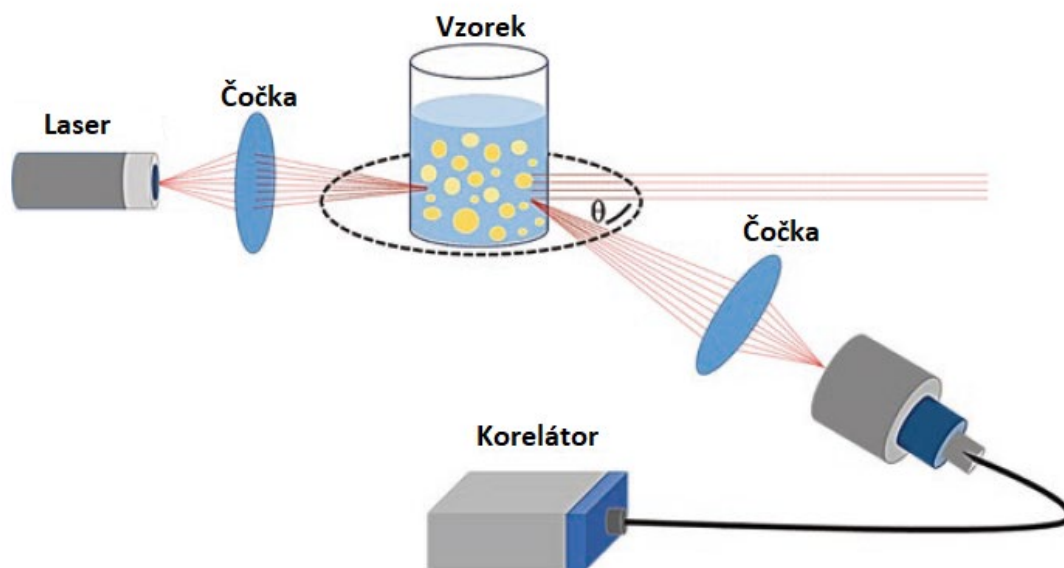
Vlastnost	Metoda
1) Tvar vezikuly	1) Elektronová mikroskopie (SEM, TEM)
2) Velikost a velikostní distribuce	2) Dynamický rozptyl světla, TEM
3) Povrchový náboj	3) Elektroforéza
4) Elektrický povrchový potenciál a pH	4) Měření zeta-potenciálu a pH sonda
5) Lamelarita	5) P_{31} - NMR
6) Uvolňování léčiva	6) Dialýza, difúzní cela
7) Účinnost enkapsulace	7) Gelová permeační chromatografie

Obr. 8 *Nejběžnější fyzikálně-chemické metody k charakterizaci nanoliposomů. Upraveno podle Sachin Salunkhe et al.²⁵*

V následujícím výčtu budou popsány pouze metody charakterizace nanoliposomů použité v rámci experimentální části této práce.

1.2.1 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Dynamický rozptyl světla je jednou z nejběžnějších metod k určení velikosti a koloidní stability nanočástic se sférickou nebo anizotropní strukturou. Při vlastním měření interaguje laserový paprsek s částicemi, dochází k rozptylu a následné interferenci záření. Intenzita dopadajícího záření se mění v důsledku Brownova pohybu částic, tzn. tyto změny dávají informaci o náhodném pohybu částic, což je použito k měření difúzního koeficientu potřebného pro výpočet samotného hydrodynamického průměru částice.²⁶ Princip měření je znázorněn na Obr. 9.



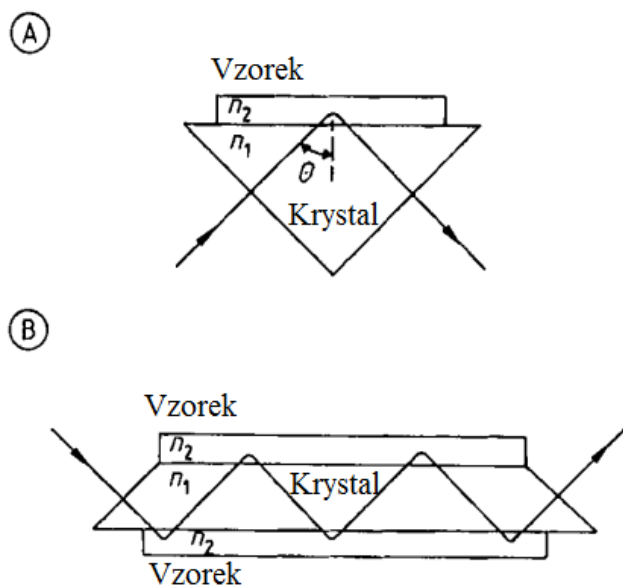
Obr. 9 Princip měření metodou DLS. Upraveno podle Ram Chandra Choudhary et al.²⁷

1.2.2 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR)

Infračervená spektroskopie je analytická metoda sloužící k charakterizaci a identifikaci struktur molekul. Je založena na interakci infračerveného záření se vzorkem – po jeho absorpci dochází ke změně vibračního stavu molekuly. Zaznamenané změny jsou poté převedeny na infračervené spektrum (závislost absorpance na vlnočtu záření). V IR-spektru můžeme pozorovat oblast charakteristických vibrací, odpovídající vlnočtu $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$, která se využívá k identifikaci funkčních skupin v molekule a oblast otisku prstu ($1500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) charakteristickou pro konkrétní molekulu.²⁸

Principem infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR) je dopad záření na interferometr; tam se rozdělí na dva paprsky, které jsou odraženy na pevné, resp. pohyblivé zrcadlo. Poté dochází k jejich interferenci, vytvoří se interferogram a z něj je pomocí Fourierovy transformace vypočítáno konečné spektrum.²⁹

FT-IR s ATR modulem poskytuje informace o přítomnosti či nepřítomnosti specifických funkčních skupin i o chemické struktuře povrchu. ATR technika zeslabeného úplného odrazu je vhodná pro silně absorbující vzorky, prášky i polymerní vrstvy, které lze snadno měřit nanesením na měrný krystal s vysokým indexem lomu. Nejběžněji využívanými krystaly jsou selenid zinečnatý, germanium, diamant nebo směs bromidu-jodidu thallného KRS-5. Princip měření je znázorněn na Obr. 10; svazek IR záření dopadá na rozhraní mezi krystalem a vzorkem pod úhlem totálního odrazu a vzniká evanescentní vlna prostupující vzorkem, který část záření absorbuje. Odražený paprsek, oslabený o absorbovanou energii, je zaznamenán jako interferogramový signál a převeden na konečné IR-spektrum.³⁰



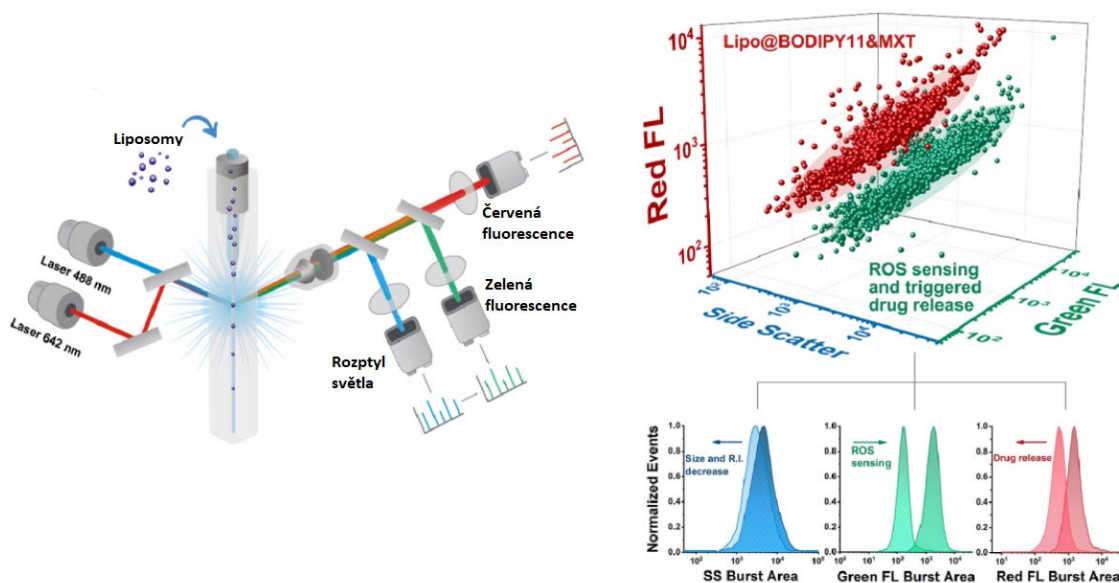
Obr. 10 ATR technika: A – jednodrazový, B – víceodrazový krystal. Upraveno podle Günzler, H. & Williams, A. (2001).³⁰

1.2.3 Nano-průtoková cytometrie

Nano-průtoková cytometrie (nFCM) je druhem průtokové cytometrie využívající optické a mechanické úpravy pro analýzu částic v submikronovém měřítku, až na velikosti částic nedosažitelné jinými průtokovými cytometry (10-40 nm v závislosti na povaze substrátu). Tato metoda tak umožňuje efektivní měření extracelulárních vezikul, nanoliposomů, virů, mitochondrií a podobných entit. Jednotlivé částice jsou v proudu tekutiny hydrodynamicky fokusovány a následně vystaveny laserové excitaci. Jednofotonové detektory měří jak rozptýlené světlo, tak i fluorescenční fotony emitované připojenými fluorofory.³¹ Intenzita bočního rozptýleného světla se porovnává se standardní křivkou vytvořenou měřením směsi nanokuliček oxidu křemičitého s indexem lomu přibližně 1,45. Koncentrace vzorků je stanovována porovnáním s 250 nm nanočásticemi oxidu křemičitého o známé koncentraci.³²

V experimentální části byl použit NanoAnalyzer od firmy nanoFCM; tento analyzátor lze použít pro multiparametrovou charakterizaci přírodních i syntetických nanočástic (7-1000 nm) na úrovni jedné nanočástice. Rozptyl světla se využívá pro měření distribuce velikosti nanočástic a fluorescenční detekce k analýze chemických vlastností.

Obr. 11 znázorňuje instrumentaci a výstup měření na NanoAnalyzeru. 11-BODIPY (581/591) je zavedený fluorescenční senzor pro detekci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) v membránách. Emisní pík se v přítomnosti ROS posouvá z 590 nm na 510 nm, což má za následek zvýšení intenzity signálu v zeleném FL kanálu, zatímco je pozorován pokles intenzity signálu v červeném FL kanálu. Zde byl pro příklad vyroben ROS-responzivní liposom (Lipo@BODIPY11) pro teranostickou charakterizaci nanočástic pomocí Flow NanoAnalyzer. Do funkcionalizovaných liposomů bylo zapouzdřeno chemoterapeutické léčivo a pomocí analyzátoru se snímalo chování ROS a uvolňování léčiva. Snížená intenzita bočního rozptylu (SS) a červeného fluorescenčního signálu (FL) spolu se zvýšením zeleného FL signálu indikovaly proces trvalého uvolňování léčiva při zvýšené koncentraci H₂O₂.³³



Obr. 11 Instrumentace a výstup měření na NanoAnalyzeru. Dostupné z <https://www.nanofcm.com/nanomedicine>, upraveno.

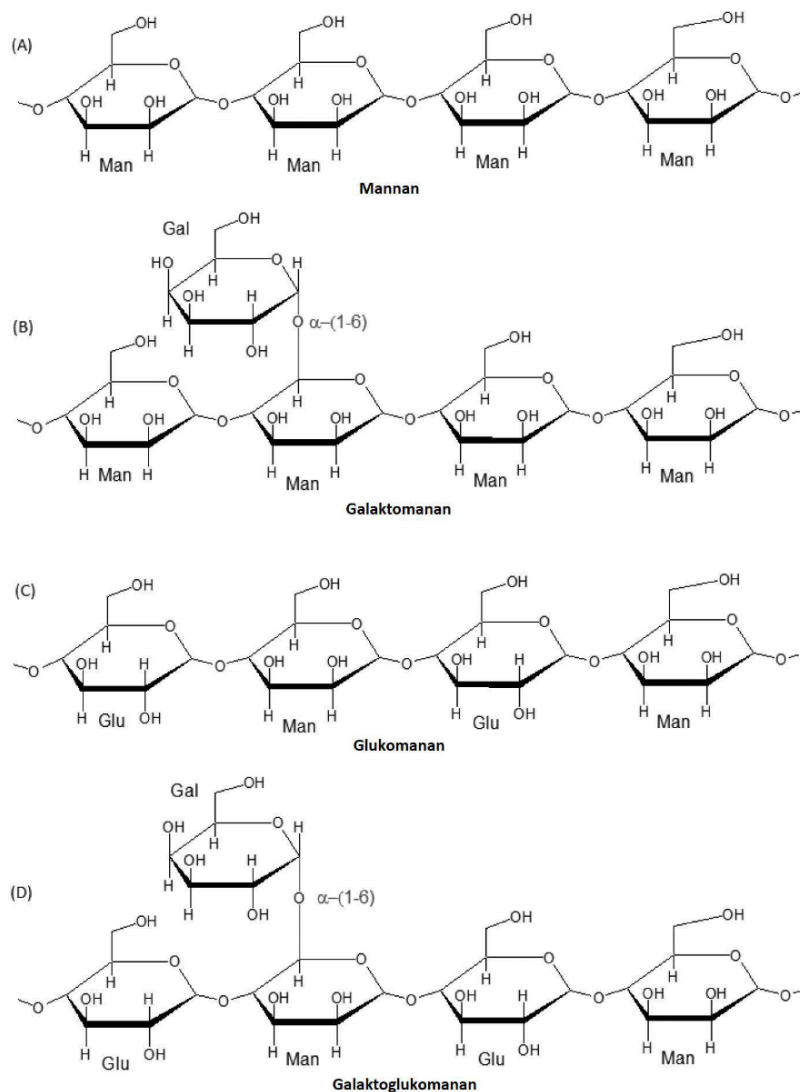
1.3 Modifikace liposomů

Liposomy jakožto nano-platforma pro různé *in vivo* aplikace by měly vykazovat sníženou toxicitu, dlouhou dobu cirkulace v krevním řečišti či zvýšenou akumulaci v nemocné tkáni. Pro takové vlastnosti můžeme povrch liposomů modifikovat pomocí různých organických i anorganických látek. Mezi ty nejběžněji používané patří jak přírodní, tak syntetické polymery. Podrobněji se budu zabývat mananem, protože tento polymer byl použit během vlastního experimentu.

1.3.1 Manan

Polysacharidy jsou přírodní, netoxické a biodegradabilní polymery, které pokrývají povrch většiny buněk a hrají důležitou roli v různých biologických mechanismech jako je například imunitní odpověď, adheze, infekce či přenos signálu.³⁴

Manany a xylany jsou dvě nejdůležitější hemicelulózy, a proto se mnoho výzkumů zaměřuje na jejich aplikace s přidanou hodnotou a hydrolýzu.³⁵ Manany jsou lineární polymery 1,4- vázaných manosových zbytků a obsahují méně než 5 % galaktózy. V přírodě je manan přítomen ve čtyřech různých formách, z nichž každá má β -1,4-vázaný hlavní řetězec obsahující manózu (lineární manan) nebo kombinaci zbytků glukózy a manózy (glukomanan) a příležitostně postranní řetězce α -1,6-vázané galaktózové zbytky (galaktomanan/galaktoglukomanan). Zbytky manózy a glukózy v základním řetězci jsou někdy acetylovány v poloze C-2 nebo C-3.³⁶ Jejich struktura je vyobrazena na Obr. 12.



Obr. 12 Chemická struktura různých forem mananu. Upraveno podle Prakram Singh Chauhan et al.³⁵

Manany jsou biokompatibilní, biodegradabilní a bioaktivní polysacharidy, které jsou díky svým vlastnostem zkoumány v mnoha odvětvích. Schopnost tvořit filmy z nich činí zajímavou alternativu k materiálům na bázi ropy; takové filmy a povlaky vykazují nízkou propustnost kyslíku a mastnoty a v některých případech relativně vysokou pevnost v tahu.³⁷ Manan je také používán jako bioaktivní materiál v medicínských aplikacích, od jeho konjugace s vakcínami až po nosiče pro cílené doručování léčiv či genů.³⁸

Manosylované liposomy představují alternativní systém pro dodávání antigenů nebo antimikrobiálních látek do makrofágů nebo dendritických buněk. Manan může být spojen s lipidy O, N nebo S glykosidickou vazbou přes rozpěrku různé délky; jak délka, tak chemický charakter rozpěrky mohou ovlivnit konformační svobodu mananu a tím i jeho schopnost být rozpoznán vhodným receptorem na buněčném povrchu.³⁹

1.3.2 Klik chemie

Klik chemie odkazuje na skupinu reakcí, které jsou rychlé, jednoduché, regiospecifické a s vysokými výtěžky produktu; jako disciplína organické chemie doprovází vývoj nosičů pro cílené doručování léčiv tím, že poskytuje syntetické cesty pro účinnou konjugaci léčiv, polymerů, cílicích ligandů apod.

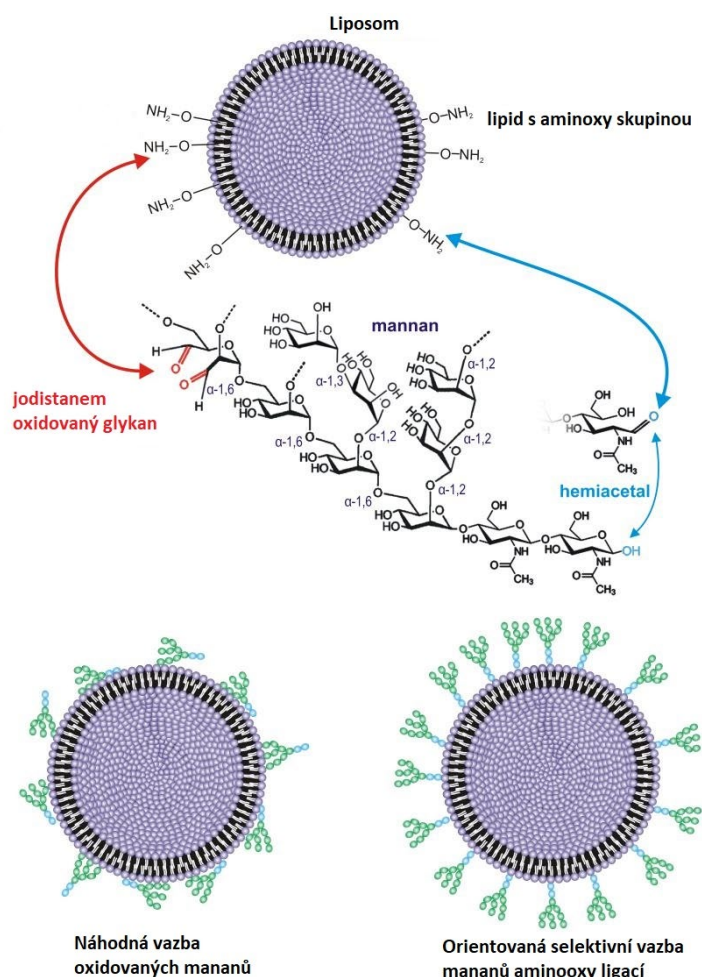
Aminoxy vazebné reakce patří do kategorie „klik chemie“ a lze je popsat jako biortogonální ligace. Tyto reakce jsou založeny na spontánní kondenzaci aminoxy funkčních skupin s dostupnou aldehydovou skupinou nebo ketonem za vzniku oximové vazby (Obr. 13).⁴⁰ Tvorba oximu je jednokroková alternativa ke dvou krokovým redukčním aminacím, např. tvorba iminu (Schiffovy báze) reakcí aminoskupiny s aldehydem nebo ketoskupinou a následnou redukcí na amin. Oximové vazby jsou také mnohem odolnější vůči hydrolýze než iminy.⁴¹



Obr. 13 Schematické vyobrazení klik chemické reakce aminoxy skupiny s aldehydem za vzniku oximu.

Upraveno podle Sébastien Ulrich et al.⁴⁰

Taková reakce je ideální metodou pro post-modifikace liposomů komplexními biologicky aktivními molekulami jako je např. manan nebo jiný poly-/oligo-sacharid. Modifikace liposomů prostřednictvím aminoxy ligace je relativně rychlý proces, který trvá několik hodin. Ortogonální charakter N-oxo reakce mezi redukujícím koncem mananu a aminoxy skupinami modifikovaného lipidu zajišťuje přesnou, jednotnou orientaci polysacharidové molekuly na povrchu liposomu, zachování molekulárního vzoru a reprodukovatelnost přípravy takto funkcionalizovaných liposomů.⁴² Schéma reakce můžeme vidět na Obr. 14, ze kterého je také patrné, že zavedení reaktivní aldehydické skupiny do polysacharidu například oxidací jodistanem zvýší počet reaktivních míst v molekule, ale na úkor ortogonalita reakce.



Obr. 14 Náhodná a orientovaná vazba mananů na povrch liposomu aminoxy ligací. Upraveno podle Elišky Bartheldyové et al.⁴³

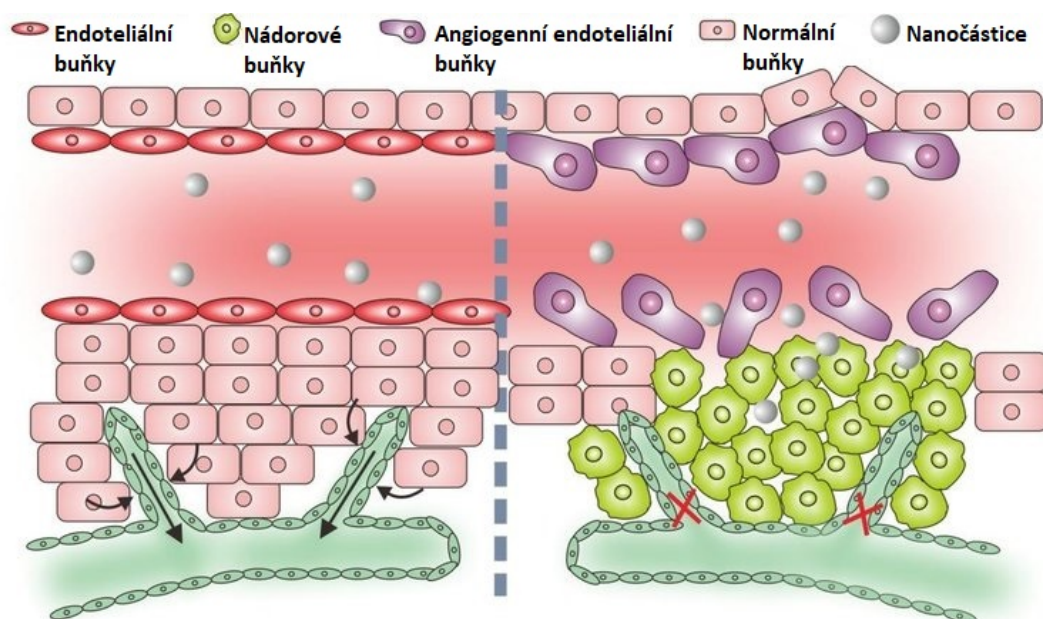
1.4 Využití v medicíně

Liposomy jsou od svého prvního popsání v roce 1961 A. Banghamem intenzivně studovány a jejich vlastností se využívá v různých oblastech – doručování léků, biomolekul či genů. Produkty na bázi liposomů jsou už běžnou součástí při léčbě rakoviny, stejně tak jsou i důležitou složkou vakcín.

1.4.1 Liposomy a léčba rakoviny

Rakovina je celosvětově hlavní příčinou úmrtí a bohužel účinnost běžných léčebných metod není v mnoha případech ideální. Hodně protinádorových sloučenin je vysoce toxických a některá cytotoxická chemoterapeutika mají krátký poločas *in vivo* kvůli své vysoce hydrofobní povaze a mají řadu vedlejších účinků, což nakonec omezuje jejich užitečnost při léčbě rakoviny.⁴⁴ Nosičový systém na bázi liposomů může být však při terapii obzvláště užitečný. Zavedení chemoterapeutik do liposomů může zlepšit jejich specifitu vůči rakovinovým buňkám a nádorovým tkáním prostřednictvím pasivního nebo ligandem zprostředkovaného aktivního cílení, což vede k minimalizaci negativních vedlejších účinků léčiv a vylepšené účinnosti díky zvýšené akumulaci liposomů v oblasti nádoru.

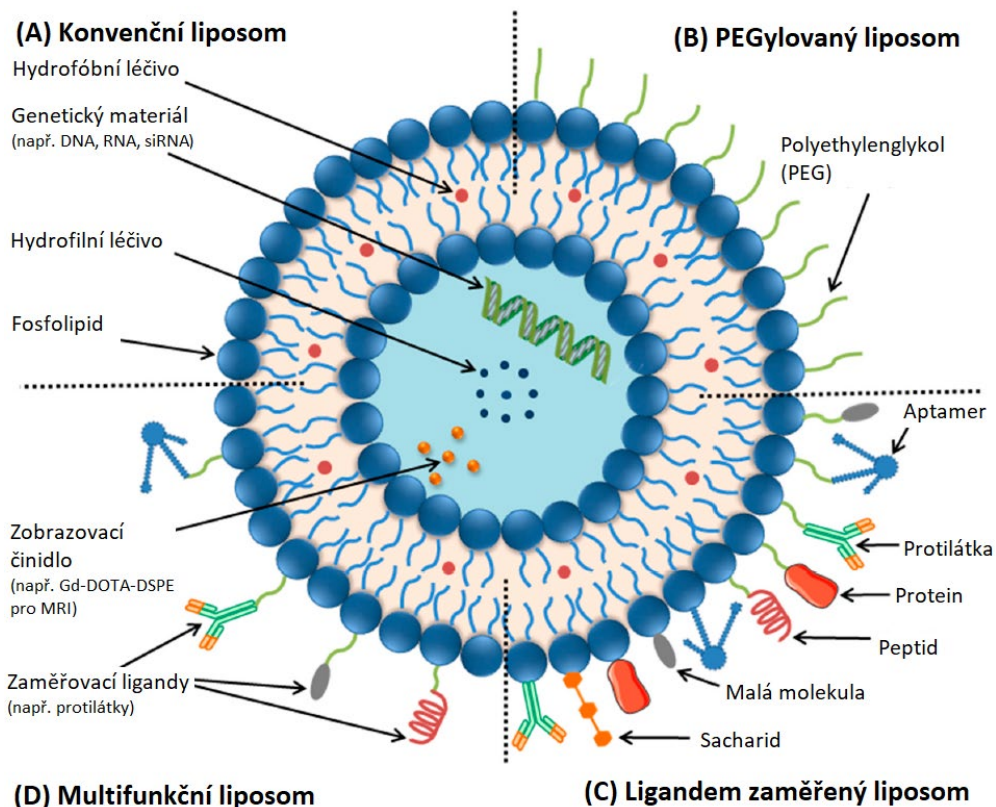
PEGylované liposomy s doxorubicinem (Doxil) se staly v roce 1995 prvním nano-nosičovým systémem k léčbě rakoviny, které byly schváleny FDA. Po léku Doxil[®] dostala povolení k léčbě různých typů rakoviny řada dalších liposomálních nosičů, a to jak Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA), tak i americkou FDA.⁴⁵ Navzdory těmto jejich úspěchům, kterých bylo dosaženo díky efektu zvýšené propustnosti a retence (EPR, Obr. 15), existuje mnoho zpráv o konvenčních liposomech s nedostatečnou selektivitou. V těchto případech se do nádorových tkání dostává minimální terapeutická koncentrace, zatímco léčivo se hromadí ve zdravé tkáni a sliznici, což vede k selhání léčby.⁴⁶



Obr. 15 Schematické znázornění efektu zvýšené permeability a retence (EPR) nanočástic v nádorech.

Nově vzniklé nádorové cévy mají obvykle abnormální strukturu, což umožňuje zadržování molekul v nádoru. Nanočástice vhodné velikosti budou tak selektivně prosakovat do nádorové tkáně (tzv. pasivní cílení na nádor). Upraveno podle Xiaodong Xie et al.⁴⁷

Proto se díky zlepšenému intracelulárnímu dodávání zaenkapsulovaných léčiv důkladně prozkoumával aktivní, ligandem zprostředkovaný, přístup. Ten zahrnuje propojení liposomů s peptidy, protilátkami, proteiny, nabitými molekulami či nízkomolekulárními ligandy a aptamery za účelem zlepšení protinádorové léčby (Obr. 16). Právě multifunkční liposomy se specifickými rysy využívající různé povrchové modifikace s možností řízeného uvolňování budou hrát zásadní roli při budoucím zlepšování rakovinové terapie.³



Obr. 16 Znárodnění (A) konvenčního liposomu z fosfolipidu, (B) PEGylovaného liposomu s vrstvou polyethylenglykolu na povrchu, (C) liposomu se specifickým ligandem pro cílení nádoru a (D) multifunkčního liposomu použitelného pro diagnózu i léčbu rakoviny. Upraveno podle Muhammad K. Raiz *et al.*⁴⁸

1.4.2 Liposomy a teranostika

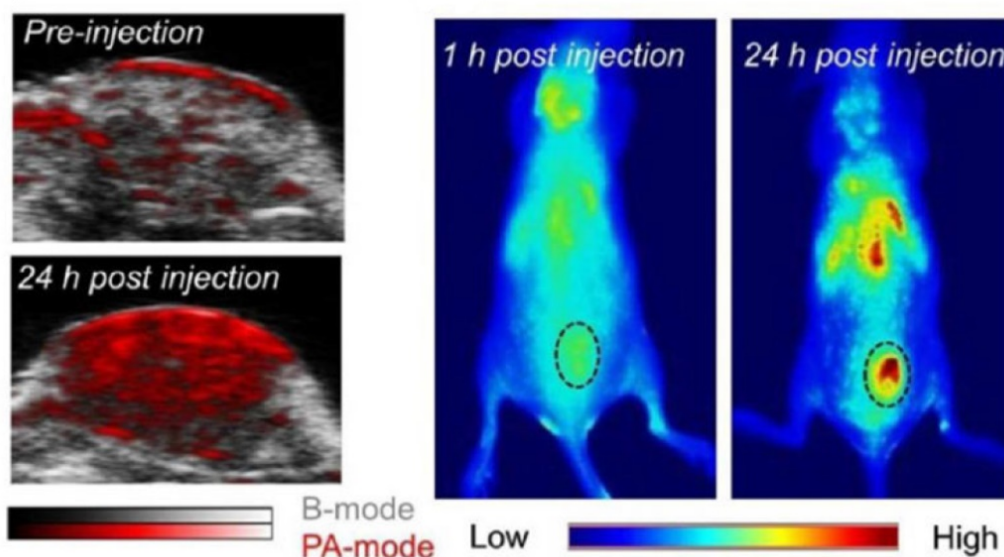
Teranostika je kombinací termínů „terapeutika“ a „diagnostika“ odkazuje na technologie, které zahrnují jak diagnostické, tak i terapeutické funkce v jednom celku. Teranostika přilákala velkou pozornost a teranostické nanonosiče jsou považovány za důležitou část medicíny nové generace. Kvalitní teranostické nanočástice umožňují monitorování dodávky léčiv v reálném čase, přesnou diagnózu a hodnocení biologických signálů, snazší stanovení odpovědi na terapii, zvýšení využití minimálně invazivních postupů a umožňují lepší rozhodnutí ohledně konce terapie.⁴⁹

Flexibilita v povrchové funkcionalizaci liposomů poskytuje možnosti pro značení různými zobrazovacími sondami, které mohou pomáhat dodávat terapeutické léky; to z liposomů umožňuje udělat multifunkční systém pro terapeutické a zároveň diagnostické účely (Obr. 16D). V počáteční fázi spoléhaly liposomové systémy hlavně na EPR efekt, známý jako pasivní cílení. Ke zobrazení účinku EPR u pacientů lze použít klinicky dostupnou technologii, jako jsou CT a MRI, ale v současné době je toto zobrazování pouze ve vývojové fázi. Doposud jen několik studií referovalo nebo klinicky analyzovalo účinek EPR u pacientů. Børresen et al. nedávno zkoumal korelaci mezi stupněm účinku EPR efektu (^{64}Cu -liposom) a nádorovou neoangiogenezí (^{68}Ga -RGD), tlakem tekutin, glykolytickou aktivitou (^{18}F -FDG) a difuzivitou (difúzní vážená MRI) k identifikaci potenciálního biomarkeru vhodného pro předpověď účinku EPR u dvou experimentálních modelů rakoviny.⁵⁰ Zjistili, že absorpce ^{64}Cu -liposomu a ^{68}Ga -RGD byla mírně korelována a autoři nakonec dospěli pouze k závěru, že se ^{68}Ga -RGD nekvalifikuje jako náhradní laboratorní biomarker a že ^{18}F -FDG (metabolická aktivita) a absorpce ^{64}Cu -liposomu spolu nesouvisí.

Kromě strategií založených na účinku EPR efektu, je dalším způsobem aktivní cílení umožňující dodávání léků nebo terapeutik do místa léze, přičemž se vyhýbají normální tkáni. Metody aktivního cílení zahrnují cílení na povrchový receptor nádorových buněk nebo na mikroprostředí nádoru a také metody, které spoléhají na změny pH, teploty či redoxního potenciálu způsobující uvolnění léčiva. Mezi nejvíce zkoumané látky, které se využívají jako tzv. „target“ patří protilátky a jejich podjednotky.

Liposomy konjugované s protilátkami, nazývané imunoliposomy, budou v budoucnu nepochybně hrát klíčovou roli v přesné diagnostice a léčbě nejen rakoviny. Hlubší znalost molekulárních dějů spojených s rakovinou, metod přípravy liposomů a zobrazovacích technik usnadní vývoj budoucích teranostických systémů.⁵¹

Obr. 17 představuje multimodální zobrazování a *in vivo* farmakokinetické chování AQ4NhCe6-liposomu, který se v dané studii prokázal jako účinná zobrazovací sonda. Multifunkční liposom obsahuje hypoxií-aktivované hydrofilní proléčivo AQ4N a fotosenzibilizátor hCe6. Vlevo je fotoakustické vyobrazení oblasti nádoru před a po 24 hodinách od intravenózního podání liposomů. Vpravo je fluorescenční zobrazení myši s nádorem 4T1 po 1 hod a 24 hod od i.v. injekci daných liposomů. Nádory jsou označeny černými kruhy.⁵²



Obr. 17 *In vivo* multimodální zobrazování a farmakokinetické chování liposomů. Převzato z Liangzhu Feng et al.⁵²

1.4.3 Liposomy a vakcíny

Očkování je nákladově nejefektivnější strategie proti mnoha typům onemocnění jako jsou patogenní infekce, rakovinné léze a dokonce revmatoidní artritida.⁵³ V oblasti vývoje vakcín se vědci zajímají už po mnoho desetiletí zejména o liposomy, a to z důvodu jejich flexibility a všestrannosti. Složení liposomů může být přizpůsobeno požadované imunitní odpovědi a charakteristice adjuvans pomocí úpravy fyzikálně-chemických vlastností vezikul jako je

náboj, velikost, typ fosfolipidu, povrchová modifikace, vazba cílicích skupin a enkapsulace antigenů.⁵⁴ Fyzikálně-chemické vlastnosti proto do značné míry ovlivňují celkovou imunitní odpověď; kromě toho targety pro vazbu k imunitním buňkám a typ připojeného adjuvans jsou faktory, které určují snadnost a cenu výroby, stejně jako možnou toxicitu. První taková aplikace liposomů byla popsána v roce 1974 a na současné pandemii COVID-19 můžeme vidět, že úspěšný vývoj vakcín na bázi liposomů stále pokračuje.

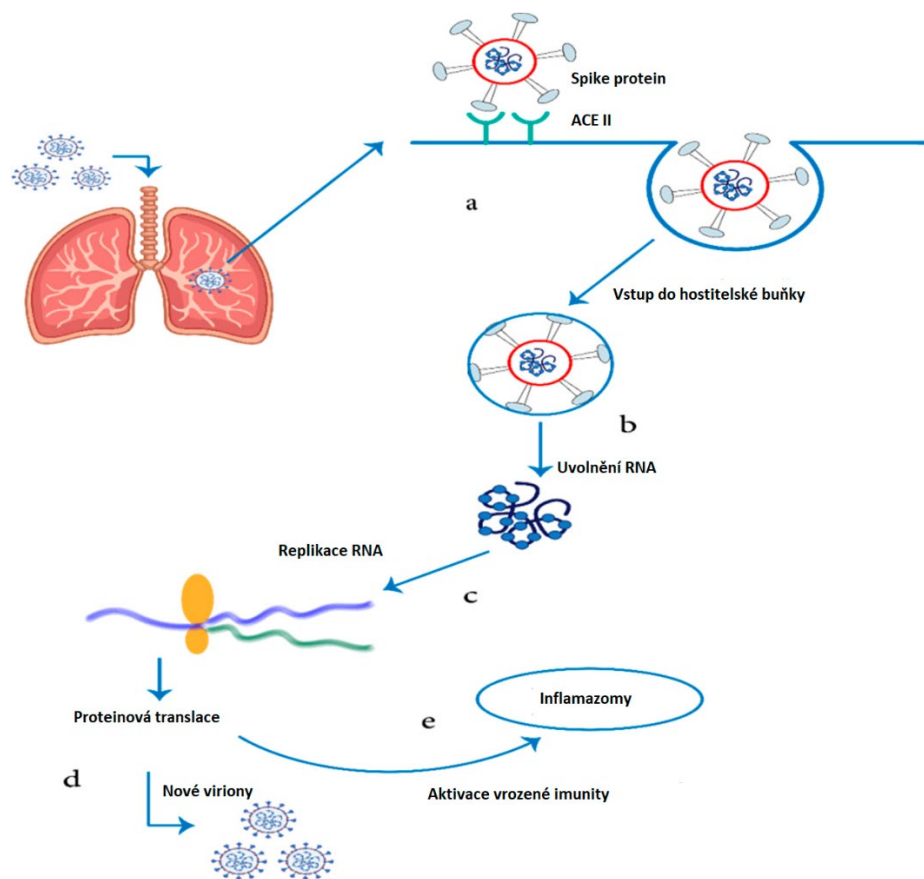
Bylo prokázáno, že liposomy stimulují humorální a buňkami zprostředkované protilátkové odpovědi, což vede ke kompletní imunologické ochraně proti různým patogenům.⁵⁵ Tato jejich jedinečná vlastnost poskytuje nejen Th2 imunitní odpovědi, ale také dlouhodobou Th1 dependentní imunitní odpověď, která je užitečná zejména proti intracelulárním patogenům.⁵⁶

Účinek liposomálního adjuvans spočívá v ochraně enkapsulovaného antigenu proti okolním podmínkám, prodloužení uvolňování, zvýšení jeho vychytávání dendritickými buňkami a zvýšení antigen-specifické imunitní odpovědi.⁵⁷

Bylo zjištěno, že kladně nabitě liposomy jsou jako adjuvans vakcíny ve srovnání s negativně nabitými a zwitteriontovými liposomy účinnější. Je to způsobeno schopností zacílit na antigeny prostřednictvím antigen-prezentujících buněk (APC) v důsledku elektrostatické interakce mezi liposomálními kationtovými skupinami a záporně nabitými molekulami na povrchu APC buněk (makrofágy, dendritické buňky); to usnadňuje intracelulární lokalizaci liposomů a uvolnění nesených antigenů.⁵⁸

Obr. 18 znázorňuje mechanismus působení vakcín na bázi lipidu s mRNA jako modelovým antigenem. Po injekci vakcíny se spustí imunitní systém a do místa vpichu se dostávají různé imunitní buňky. Na základě *in vivo* studií bylo zjištěno, že primární monocyty a podskupiny dendritický buněk překládají mRNA, což pravděpodobně zahrnuje endocytózu.⁵⁹ Poté APC

buňky prostřednictvím migrace do lymfatických uzlin prezentují mRNA-kódované antigeny B a T lymfocytům. mRNA vakcíny také zapojují vrozený imunitní systém ke zlepšení schopnosti indukovat antigen-specifickou imunitní odpověď. Lymfatická migrace buněk přirozené imunity je zesílena rozlišováním zánětlivých stimulů. Navíc se stimulují i APC buňky, a proto mohou poskytovat kostimulační signály a cytokinové reakce.⁶⁰



Obr. 18 Znárodnění RNA viru SARS-COV-2: (a) Virus SARS-COV-2 vstupuje do hostitelských buněk epitelu dýchacích cest endocytózou přes receptor ACE2. (b) Uvolnění virové RNA do cytosolu. (c) Replikace RNA prostřednictvím ribozomů. (d) Translace proteinů a tvorba nových virionů. (e) Aktivace vrozené imunity a proinflamačních cytokinů a lymfocytů (T lymfocyty, IL-1, IL-6, IL-8, IL-21 a TNF-β). Upraveno podle Mohamed Ahmed Attia et al.⁶⁰

mRNA vakcíny proti COVID-19 vyvinuté společnostmi Pfizer/BioNTech a Moderna jsou vyrobeny z lipidových nanočástic nesoucí syntetickou mRNA. Tato mRNA kóduje spike protein viru COVID-19, který zprostředkovává jeho připojení, rozpoznání receptoru ACE2, fúzi a penetraci hostitelských buněk.⁶¹ Povrch použitých liposomů byl modifikován polyethylenglykolem (PEG), který zvyšuje jejich stabilitu a dobu oběhu v krevním řečišti. Lipidové složení kationtových vezikul je v obou vakcínách podobné a obsahuje PEGylované fosfolipidy, cholesterol a pomocný fosfolipid distearoylfosfatidylcholin (DSPC).⁶⁰

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2 CÍLE PRÁCE

V teoretické části této práce bylo cílem shrnout dosavadní poznatky o:

- Nanoliposomech, jejich vlastnostech, přípravě a metodách charakterizace
- Povrchové modifikaci těchto částic
- Využití nanoliposomů v medicíně

Cílem experimentální části bylo:

- Připravit nanoliposomy a cíleně modifikovat povrch těchto částic polymery
- Charakterizovat jejich vlastnosti pomocí různých fyzikálně-chemických metod
- Studovat, jak tyto částice stimulují cesty imunitní odpovědi na vybraných buněčných liniích

3 MATERIÁLY A METODY

3.1 Materiály

3.1.1 Chemikálie

- Vaječný fosfatidylcholin EPC (Avanti Polar Lipids)
- N-oxy lipid (Nexars)
- Čistý etanol EtOH (Sigma-Aldrich)
- Chloroform CHCl₃ (Sigma-Aldrich)
- norAbu-MDP-Lys-L18 MT05 (Nexars)
- Extrahovaný polysacharid manan (Nexars)
- Fosfátový pufr PBS o pH 7,4 (Serana)
- Kultivační médium DMEM High Glucose (Biosera)
- Kultivační médium RPMI-1640 (Biosera)

3.1.2 Přístroje

- Extrudér HandExtruder (Genizer)
- Rotační vakuová odparka Hei-VAP Expert (Heidolph)
- ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd)
- Nano-průtokový cytometr NanoAnalyzer (NanoFCM)
- FT-IR spektrometr Invenio (Bruker)
- Optický mikroskop Leica DM IL LED (Leica Microsystems)
- CO₂ inkubátor CellXpert C170i (Eppendorf)
- Laminární biohazard flow-box Herasafe 2030i (ThermoFisher Scientific)
- Multidetekční reader SynergyNeo (BioTek)

3.1.3 Biologický materiál

Pro ověření stimulačního efektu připravených liposomů se testovala aktivace inflamasonu NLRP3 na lidských monocytárních buňkách THP1-Null Cells a na reportérové buněčné linii HEK-Blue™ IL-1 β Cells. Veškeré buňky včetně příslušných antibiotik a látek pro pozitivní kontroly měření pochází od firmy InvivoGen.

Buňky THP1-Null Cells se kultivují v kultivačním médiu RPMI 1640 s obsahem 4,5 g/l glukózy, 2 mM L-glutaminu, 1,5 g/l hydrogenuhličitanu sodného, 10 mM HEPES, 1 mM pyruvátu sodného a s 10% fetálním bovinním sérem FBS. Médium také obsahuje antimikrobiální (Penicilin-Streptomycin, Normocin) a selekční antibiotika (Hygromycin B). Reportérové buňky rostou na kultivačním médiu DMEM obsahující 4,5 g/l glukózy, 10% FBS, 2 mM L-glutaminu, antibiotika (Pen-Strep) a selekční antibiotika Zeocin a Hygromycin B.

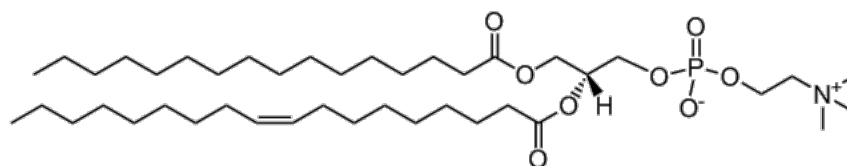
3.2 Metody

3.2.1 Syntéza a povrchová modifikace liposomů

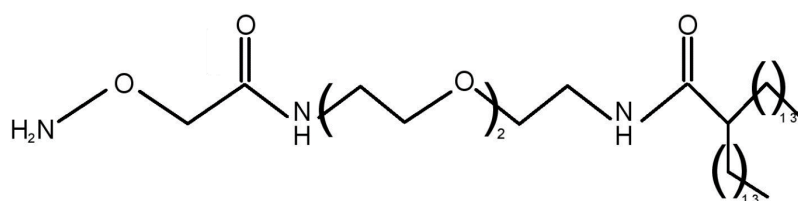
Liposomy byly připraveny hydratací lipidového filmu. První typ liposomů obsahoval z 99 % nosný lipid EPC a 1 % N-oxy lipidu. Směs dalších liposomů obsahovala EPC z 94 %, N-oxy lipid (1 %) a látku MT05 z 5 %. Chemické vzorce použitých látek jsou zobrazeny na Obr. 19. V každém případě se výchozí látky rozpustily v chloroformu a poté byla směs ve skleněné baňce s kulatým dnem přemístěna na rotační vakuovou odparku. Po 4 hodinách se chloroform kompletně odpařil a vzniklý lipidový film se hydratoval fosfátovým pufrům PBS. Konečná koncentrace obou druhů liposomů byla 20 mg/ml. Takto připravené liposomy se extrudovaly přes 400 nm a poté přes 100 nm extruzní polykarbonátový filtr.

Pro měření pak byly nachystány celkově 4 vzorky – liposomy čisté, liposomy s MT05, liposomy s mananem a liposomy obsahující MT05 i manan. K modifikaci liposomů byl použit roztoku mananu rozpuštěný v PBS na celkovou koncentraci 1 mg/ml; mananu bylo přidáno tak, aby na 1 mg liposomů připadlo 0,1 mg mananu. Finální koncentrace liposomů pro měření byla 5 mg/ml.

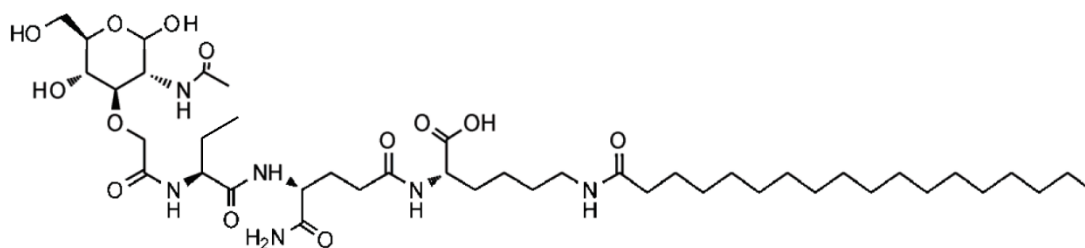
a)



b)



c)



Obr. 19 Chemické struktury použitých lipidů a) EPC, b) N-oxy a c) modifikovaného muramyl dipeptidu *norAbu-MDP-Lys-L18* (MT05).

3.2.2 DLS měření

Měření DLS vhodně koncentrované disperze bylo provedeno za použití ZetaSizer Nano ZS. Pro měření vždy 50 μ l vzorku byla použita křemenná kyveta ZEN 2112. Částice byly měřeny v prostředí fosfátového pufru PBS. Každé měření se provádělo 3 \times z důvodu stanovení průměrné hodnoty.

3.2.3 FT-IR spektrometrie

Infračervená spektra byla měřena na spektrometru Invenio metodou ATR. Na diamantový krystal se nakápl vždy 50 μ l vodné disperze vzorku. Spektra byla získána shromážděním 32 skenů. Jako pozadí měření byl použit fosfátový pufr PBS.

3.2.4 Nano-průtoková cytometrie

K měření jednotlivých částic ve vzorku byl použit nano-průtokový cytometr NanoAnalyzer, kde se sledoval kanál pro rozptyl světla. Velikostní distribuce (v rozsahu 80-160 nm) i koncentrace částic byla porovnávána s nanočásticemi oxidu křemičitého, které byly použity pro kalibraci přístroje.

3.2.5 Kultivační podmínky a pasážování

Všechny experimenty s buňkami byly prováděny *in vitro*. Pro navození podmínek prostředí živého organismu byly buňky kultivovány v příslušném růstovém médiu a uchovávány v inkubátoru s 5% atmosférou CO₂ při teplotě 37 °C; s buňkami se pracovalo sterilně v laminárním flow-boxu.

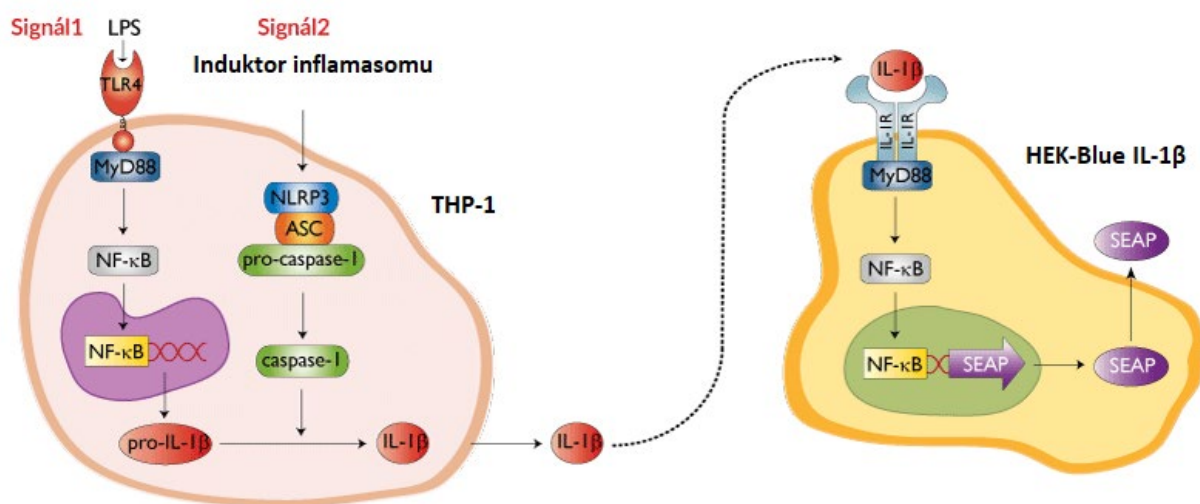
Růst buněk byl pravidelně kontrolován pod optickým mikroskopem – při konfluenci 70-80 % se buňky přenesly do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem, aby nedocházelo ke kontaktní inhibici růstu. Postup pasážování přisedlé reportérové buněčné linie odvozené z HEK buněk zahrnuje odstranění starého média, promytí buněk fosfátovým pufrům PBS a uvolnění buněk ode dna kultivační lahve poklepem. Poté se přidá čerstvé médium a buňky se jemně resuspendují pipetou. Suspenzní reportérová buněčná linie odvozená od lidské THP1 buněčné linie se zcentrifuguje, odstraní se supernatant a k sedimentu se přidá čerstvé médium. Následně se do nové kultivační nádoby přepipetuje zhruba 0,5 ml roztoku a doplní se médiem do vhodného objemu (5-10 ml).

Pro nasazení buněk do 96-ti jamkových destiček se v Bürkerově komůrce spočítalo množství buněk v 1 ml roztoku, poté se buňky naředily podle potřeby a rozpipetovaly do jamek kultivační destičky. Z důvodu stanovení průměru a směrodatné odchylky bylo každé měření prováděno v triplikátu.

3.2.6 Aktivace inflamasomu NLRP3

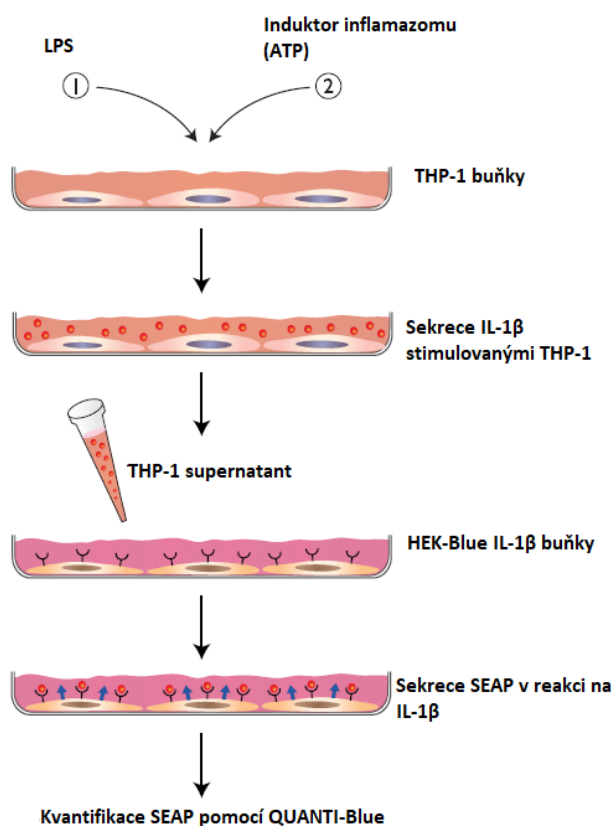
Pro ověření, zda připravené liposomální látky aktivují inflamasom NLRP3 se použily lidské monocytární buňky THP1-Null Cells. Inflamasom NLRP3 je kritickou složkou vrozeného imunitního systému. Je to v cytosolu uložený multiproteinový oligomer, který se aktivuje po setkání buňky s celou řadou patogenů nesoucích PAMP (virového, bakteriálního či mykotického původu, např. lipopolysacharidy LPS, peptidoglykany) nebo s molekulárními vzory souvisejícími s nebezpečím, které jsou generovány vlastní buňkou (DAMP); jedná se například o krystaly urátu sodného či cholesterolu, reaktivní kyslíkové radikály ROS nebo extracelulární ATP. Po setkání jednotlivých složek inflamasomu s těmito patogeny, dochází k aktivaci kaspázy-1 a k následné produkci a sekreci prozánětlivých cytokinů IL-1 β a IL-18. NLRP3 také indukuje prozánětlivou formu programované buněčné smrti – pyroptózu.

Pro aktivaci NLRP3 jsou nutné dva signály. Prvním signálem je aktivace buněčného Toll-like receptoru 4, např. bakteriálním LPS, po kterém je v buňce syntetizován neaktivní pro-IL-1 β . Druhým signálem je rozpoznání PAMP či DAMP (induktoru inflammasomu) odpovídající doménou. Pak dochází k proteolytickému štěpení pro-kaspázy-1 za vzniku aktivní kaspázy-1, a ta přeměňuje neaktivní pro-IL-1 β v aktivní prozánětlivý IL-1 β , který je poté sekretován mimo buňku (Obr. 20, 21).



Obr. 20 Produkce IL-1 β stimulovanými THP-1 buňkami a jeho detekce pomocí reportérových HEK-Blue IL-1 β buněk. Upraveno; dostupné na <https://www.invivogen.com/alum>.

Pro detekci bioaktivního IL-1 β pak byla použita reportérová buněčná linie HEK-Blue IL-1 β , do které byl vnesen gen pro sekreci SEAP (sekretované embryonální alkalické fosfatázy). Tyto buňky přirozeně exprimují receptor IL-1 β (IL-1R) a všechny proteiny zapojené do signální dráhy vedoucí k aktivaci nukleárního faktoru NF- κ B. Po navázání IL-1 β na IL-1R se tedy spustí kaskáda vedoucí k aktivaci NF- κ B a k následné produkci SEAP do média (viz Obr. 20, 21). Množství SEAP je přímo úměrné množství IL-1 β a lze tedy prostřednictvím sekrece SEAP kvantifikovat množství IL-1 β v médiu. Pro detekci SEAP se používá detekční médium QUANTI-Blue.

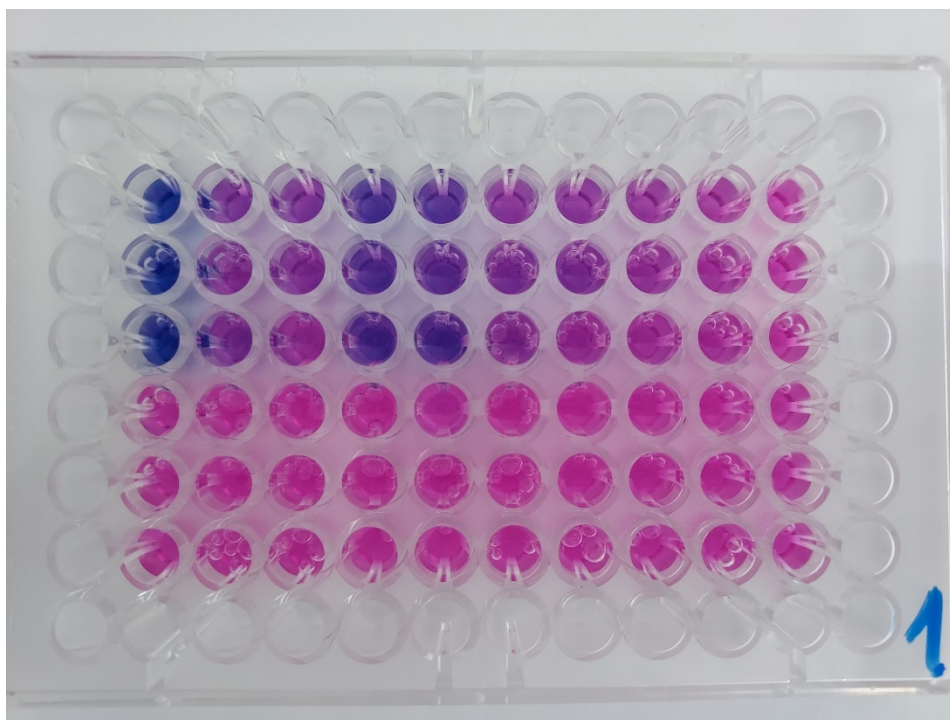


Obr. 21 Metoda detekce IL-1 β sekretovaného stimulovanými THP-1 buňkami pomocí reportérových HEK-Blue IL-1 β buněk. Upraveno podle katalogu buněk firmy InvivoGen.

Pro aktivaci THP1-Null Cells se první den připravila buněčná suspenze obsahující přibližně 200 000 buněk na ml; ta se v objemu 180 μ l přidala do jamek kultivační destičky a doplnila 20 μ l LPS o koncentraci 10 μ g/ml. Buňky se s LPS nechaly 3 hodiny inkubovat. Na kultivační destičku byly také vysazeny buňky bez LPS. Po inkubaci bylo médium odebráno a přidáno nové. Jako pozitivní kontrola, induktor inflamazomu, se přidalo ATP o koncentraci 5 mM, negativní kontrolou byly samotné buňky. Připravené různé typy liposomů byly přidány v koncentraci 30, 75, 150 a 300 μ M. Takto připravená kultivační destička se ponechala 2 dny v inkubátoru.

Pro detekci IL-1 β byla připravena suspenze buněčné linie HEK-Blue IL-1 β s obsahem přibližně 330 000 buněk na ml. Do nové kultivační destičky se odebralo 50 μ l supernatantu z THP1-Null Cells a doplnilo 150 μ l buňkami HEK-Blue IL-1 β . Pro pozitivní kontrolu se přidalo 50 μ l rekombinantního lidského proteinu IL-1 β (0,25 μ g/ml), negativní kontrolou bylo 50 μ l rekombinantního lidského proteinu TNF- α , na který buňky nereagují. Opět se buňky ponechaly inkubovat 2 dny.

Poté, pro měření míry sekretované alkalické fosfatázy, se odebral supernatant (50 μ l) a přidal se k rozsuspendovanému SEPA detekčnímu médiu QUANTI-Blue (150 μ l) na nové kultivační destičce. Toto médium se v přítomnosti alkalické fosfatázy zbarvuje modře (Obr. 22). Po inkubaci se destička vložila do spektrofotometru a míra zbarvení se kvantifikovala při vlnové délce 630 nm.



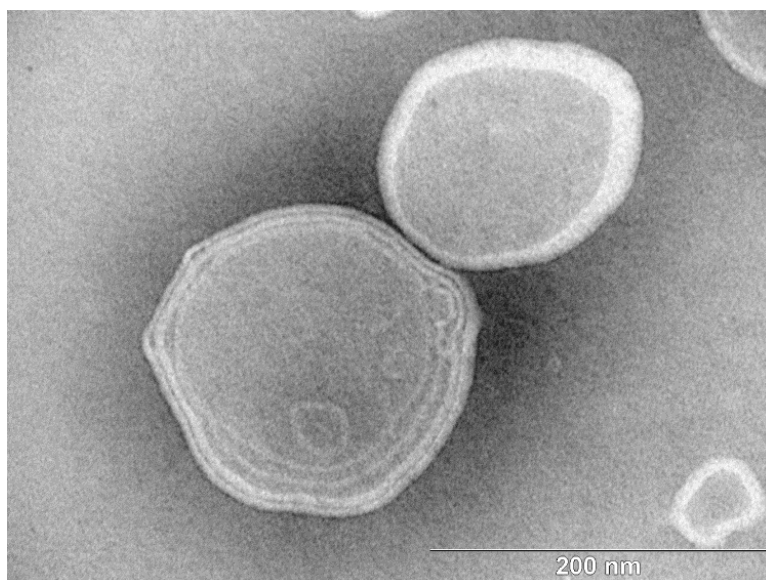
Obr. 22 Ukázka kultivační destičky s detekčním médiem QUANTI-Blue; 3 horní řádky buněk byly naznačeny jak LPS, tak liposomálními preparáty, spodní jsou bez signálu LPS, tudíž nedochází k sekreci IL-1 β , následně SEAP a detekční médium se nezbarvuje do modra.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

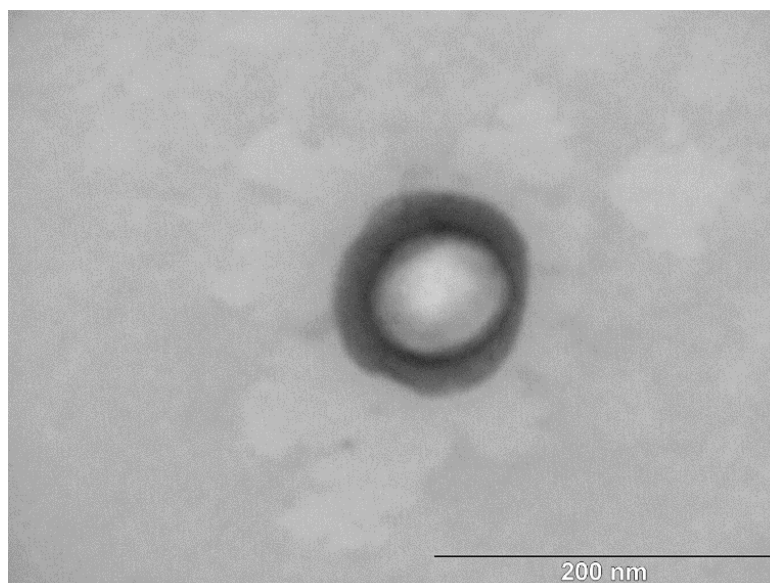
4.1 Fyzikálně-chemická charakterizace částic

4.1.1 Transmisní elektronová mikroskopie

Morfologie liposomů a potvrzení vazby mananu na liposomální povrch byla zkoumána pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Obr. 23 vyobrazuje čisté liposomy připravené metodou hydratace lipidového filmu s jednotným sférickým tvarem. Nanoliposomy s navázaným mananem jsou vyobrazeny na Obr. 24. U modifikovaných částic se objevuje vysoký kontrast po obarvení 2% fosfowolframanem amonným – černá vrstva mananu i rozmazanější okraje liposomů způsobené povrchovou modifikací potvrzují vazbu polysacharidu na povrch. Liposomy s MT05 nebyly podrobeny TEM analýze, protože tato látka se zabudovává přímo do lipidové membránové struktury, a proto nemá vliv na vzhled liposomů pod TEM.



Obr. 23 TEM snímek čistých liposomů připravených hydratací lipidového filmu (měřítko 200 nm).

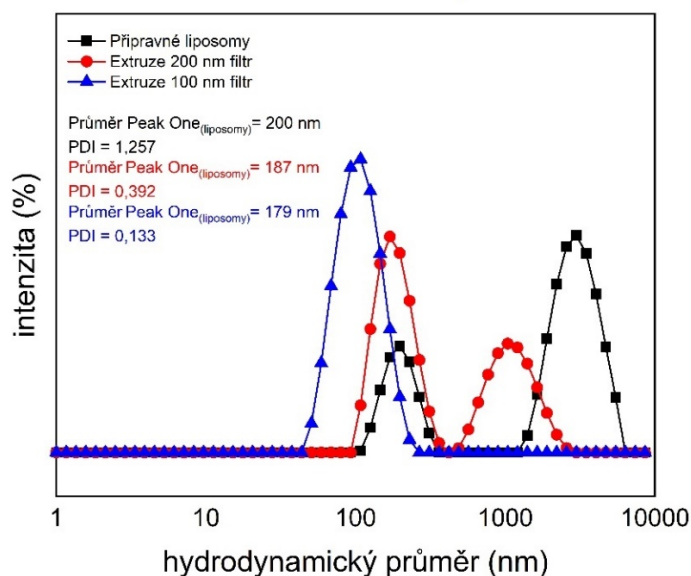


Obr. 24 TEM snímek modifikovaných liposomů s patrnou vrstvou mananu (měřítko 200 nm).

4.1.2 DLS analýza

Velikost a koncentrace připravených i modifikovaných liposomů byla stanovena metodou DLS. Na Obr. 25 je zobrazen vliv extruze na velikost liposomů; distribuce velikosti těchto částic je znázorněna na základě intenzity. U připravených neextrudovaných liposomů (značeno černě) můžeme pozorovat dva píky. Menší z píků (Peak One) patří liposomům, jejichž průměrná velikost je 200 nm. Větší pík, o průměrné velikosti částic cca 3100 nm, odpovídá větším aglomerátům, které jsou pro další měření nežádoucí. Na to, že neextrudované liposomy jsou velice heterogenní, poukazuje i značně velká hodnota indexu polydisperzity PDI, která činí 1,257. Koncentrace liposomů byla přibližně $3,6 \cdot 10^5$ částic na ml, zbytkové lipidy měly koncentraci o 3 řády vyšší ($2,5 \cdot 10^8$ částic/ml).

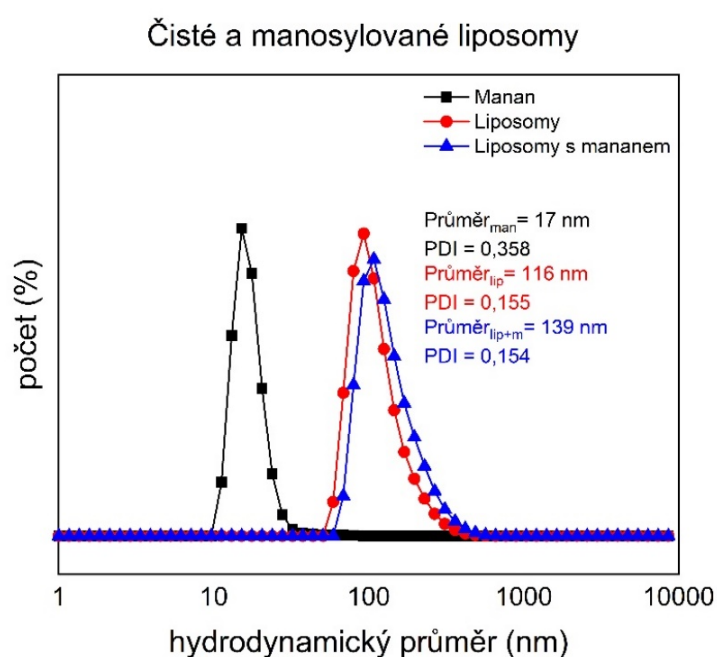
Vliv extruze na velikost liposomů



Obr. 25 Vliv extruze na velikost liposomů připravených (černě), extrudovaných přes 200 nm filtr (červeně) a přes 100 nm filtr (modře). Velikostní distribuce je znázorněna na základě intenzity.

Liposomy byly dále extrudované přes 200 nm filtr (značeno červeně). Opět můžeme pozorovat 2 píky, ale jejich rozdělení je téměř opačné – zvýšila se intenzita píku liposomů (Peak One), zmenšila se jejich průměrná velikost na 187 nm a koncentrace se zvýšila o 5 řádů na $1,7 \cdot 10^{10}$ částic v ml. Systém také začíná být podstatně více homogenní – hodnota PDI je 0,392. I u druhého píku nežádoucí velikosti liposomů klesla intenzita, velikost (cca 1160 nm) a koncentrace ($5,4 \cdot 10^7$ částic/ml). Pro konečnou úpravu velikosti liposomů byl použit 100 nm filtr (značeno modrou barvou). Touto finální extruzí vznikla suspenze samotných liposomů o průměrné velikosti 179 nm a koncentraci $2 \cdot 10^{10}$ částic na ml. Homogenitu liposomů také dosvědčuje hodnota PDI 0,133. Z grafu je tedy přehledně vidět, že extruze je velice efektivní metoda pro úpravu velikosti a homogenity připravených liposomů.

Na následujících grafech (Obr. 26 a 27) jsou výsledky analýzy celkem 4 různých typů liposomů připravených metodou hydratace lipidového filmu, které byly extrudovány přes 400 a 100 nm filtr, viz kapitola 3.2.1. První vyobrazené jsou čisté extrudované liposomy společně s liposomy modifikovanými mananem; graf také obsahuje spektrum samotného mananu. Na druhém grafu jsou liposomy, které už byly připravovány společně s látkou MT05 a také část těchto liposomů obsahující i manan. Oba grafy vyobrazují distribuci velikostí liposomů na základě počtu. V grafech je uvedena průměrná velikost ze 3 měření a index polydisperzity PDI.



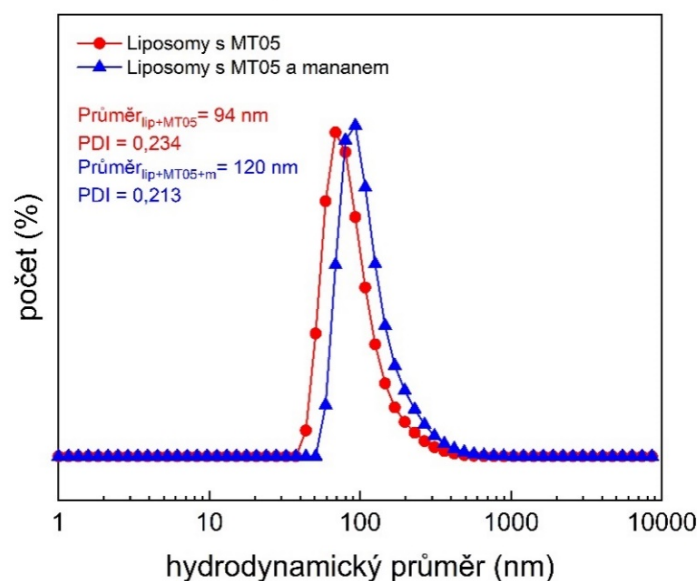
Obr. 26 Distribuce velikostí (na základě počtu) čistých připravených liposomů (červeně) a modifikovaných liposomů s mananem (modře). Spektrum samotného mananu je značeno černou barvou.

Horní i následující graf opět potvrzuje, že se podařilo připravit liposomy bez znatelné přítomnosti agregátů z důvodu výskytu pouze jednoho píku distribuce velikosti částic. Vyobrazené liposomy byly použity i pro všechny další metody charakterizace včetně *in vitro* testování na buňkách.

Čisté liposomy z Obr. 26 (označeno červeně) mají průměrně velikost 116 nm s PDI 0,155. U liposomů modifikovaných mananem (modře) lze pozorovat nárůst velikosti z důvodu vazby mananu na jejich povrch; konkrétně nárůst činí 23 nm. Samotný manan (černě) vykazuje průměrnou velikost 17 nm. Hydrodynamický průměr modifikovaných částic by se měl díky vazbě mananu po celém povrchu liposomů zvýšit o 2×17 nm, tedy 34 nm. Mnou změřené spektrum mananu však vykazuje podstatně větší průměrnou hodnotu než je skutečná velikost samostatného nataženého polymeru; například DLS měření nativního mananu v publikaci M. Rabyka et al. ukazuje na velikost 1,2 nm či publikace E. Bartheldyové et al. na 4 nm.^{62, 43} Roztok mananu, který byl pro měření použit, je zřejmě mírně agregovaný a jeho jednotlivé řetězce tak nejsou úplně natažené. Z tohoto důvodu i nárůst předkládaných 23 nm na velikosti částic modifikovaných roztokem 17 nm mananu opravdu dokazuje vazbu polymeru na povrch, což prokazuje i elektronová mikroskopie.

Posledním výstupem z DLS je Obr. 27, kde jsou zbylé dva typy nanoliposomů. Tyto liposomy byly připravovány s látkou MT05, která už je zabudovaná přímo ve struktuře liposomů a mírně zvyšuje jejich polydisperzitu. Samotné liposomy s MT05 (červeně) mají průměrnou velikost 94 nm, ty modifikované mananem (modře) 120 nm, tedy opět se velikost díky mananu zvýšila o 26 nm a i u tohoto typu částic můžeme potvrdit vazbu polymeru na povrch.

Liposomy s MT05 i mananem

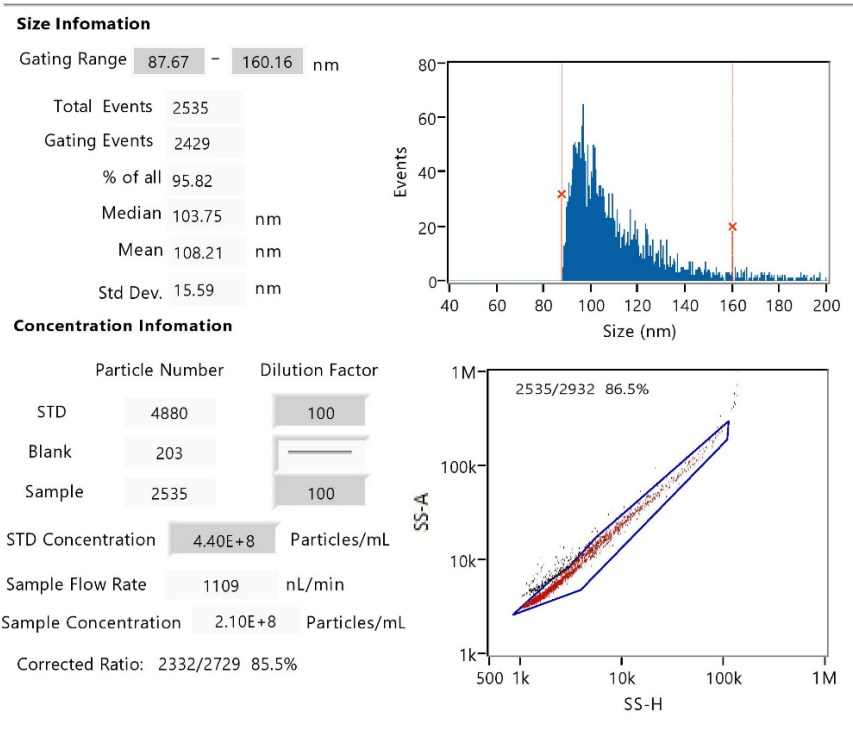


Obr. 27 Distribuce velikostí (na základě počtu) liposomů připravených s MT05 (červeně) a modifikovaných liposomů s MT05 a mananem (modře).

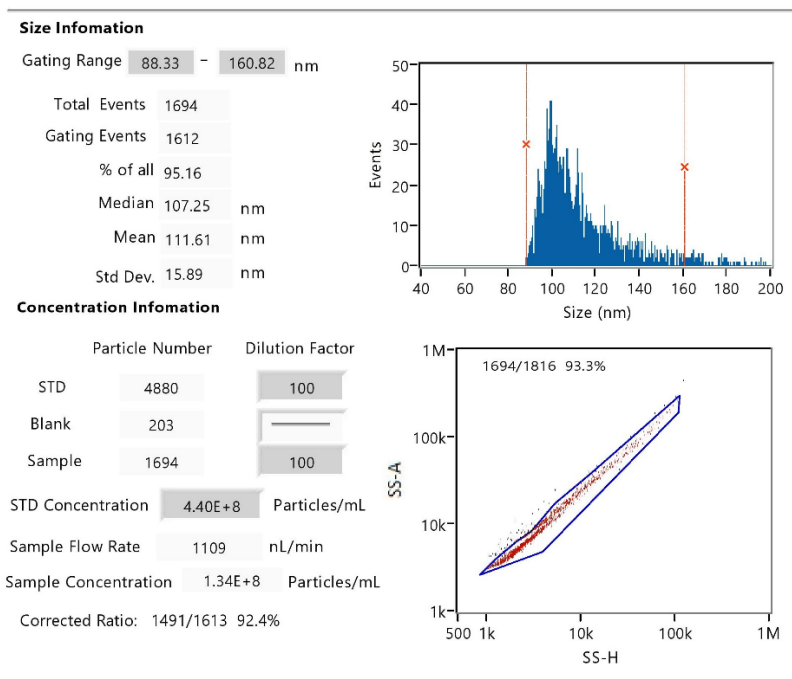
Důležité také je, že i po modifikaci zůstal počet všech druhů liposomů na ml zachován a pohybuje se ve stále stejném řádu (10^{11}), což dokazuje, že vazba mananu neovlivňuje stabilitu samotných liposomů.

4.1.3 Nano-průtoková cytometrie

Velikost a koncentrace liposomů byla studována i pomocí nano-průtokové cytometrie. Tato metoda měření je v porovnání s metodou DLS přesnější, protože měří jednotlivé částice vzorku. Dále, na Obr. 28, lze pozorovat výsledky analýzy čistých liposomů hydratovaných z lipidového filmu extrudovaných přes 100 nm filtr; průměrná hodnota velikosti je cca 108 nm. Na Obr. 29 je výsledný graf měření manosylovaných liposomů, u kterých je průměrná hodnota téměř 112 nm. Nárůst na velikosti (+4 nm) modifikovaných liposomů opět potvrzuje vazbu polysacharidu na povrch a tato velikost by měla odpovídat i skutečné velikosti mananu.



Obr. 28 Měření velikosti a koncentrace neznačených liposomů metodou nano-průtokové cytometrie.

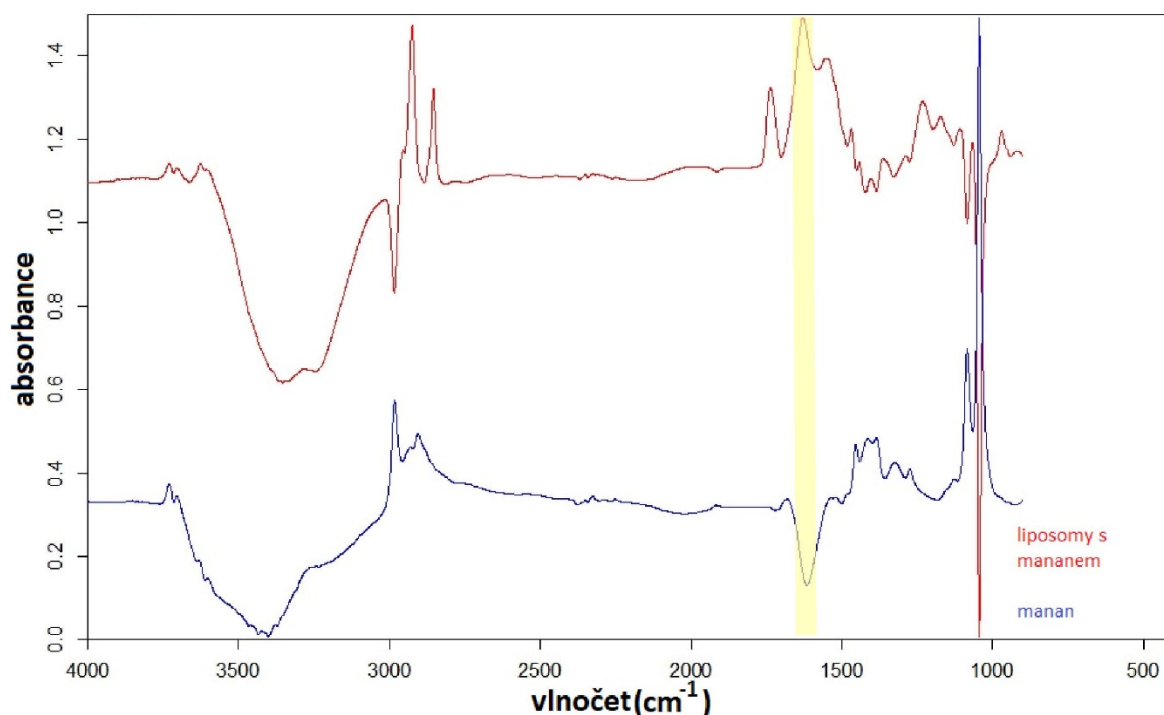


Obr. 29 Měření velikosti a koncentrace liposomů modifikovaných mananem metodou nano-průtokové cytometrie.

4.1.4 FT-IR analýza

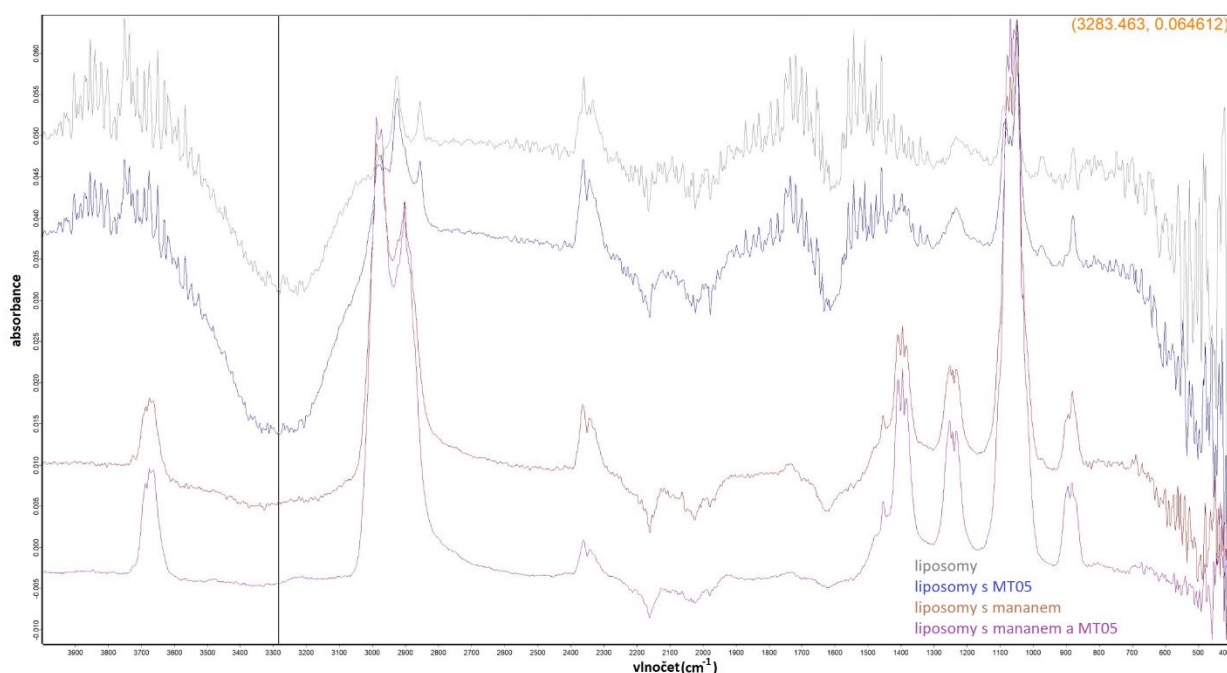
Pro potvrzení úspěšného navázání mananu na liposomální povrch byla provedena FT-IR analýza. Obr. 30 porovnává získané spektrum mananu (modře) a liposomů modifikovaných mananem (červeně) měřených na pozadí fosfátového pufru PBS. Z grafů je přehledně vidět, že se daný polymer na povrchu liposomů nachází. Spektrum mananu také koresponduje s naměřeným spektrem v článku Vishva Muru et al.; na základě tohoto článku by poté píky mananu měly představovat při vlnočtu přibližně 3235 cm^{-1} vazbu O-H, 2898 cm^{-1} C-H, 1643 cm^{-1} C=O (připojené k amidu), 1622 cm^{-1} N-H (amid), 1530 cm^{-1} N-H (amid) a při vlnočtu cca 1040 cm^{-1} vazbu C-O (alkohol).

Zvýrazněný pík při vlnočtu $\sim 1621\text{ cm}^{-1}$, který lze pozorovat na spektru manosylovaných liposomů, odpovídá vazbě C=N. Tato vazba prokazuje proběhlou oximovou ligaci a tudíž je dalším důkazem o úspěšném navázání polysacharidu na liposomální povrch.



Obr. 30 FT-IR spektra samostatného mananu (modře) a liposomů modifikovaných mananem (červeně).

Na Obr. 31 jsou spektra všech připravených typů liposomů. Šedě jsou značeny liposomy čisté, ty s MT05 modře, manosylované liposomy jsou označeny hnědou barvou a liposomy kombinující obě látky fialovou. Na tomto grafu jde vidět strukturní podobnost (jen jiný poměr C-H vazeb) samotných liposomů a liposomů s MT05. Stejně tak podobná spektra mají oba typy liposomů modifikovaných mananem. Patrné jsou peptidové píky kolem 1400 cm^{-1} (MT05) a pík mananu u $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$.



Obr. 31 FT-IR spektra liposomů (šedě), připravených s MT05 (modře), liposomů s mananem (hnědě) a liposomů s MT05 modifikovaných mananem (fialově).

4.2 Výsledky biologických testů

4.2.1 Aktivace inflamasomu NLRP3

Tato diplomová práce je zaměřena na vývoj adjuvantních liposomů, které by se daly použít pro konstrukci rekombinantních vakcín. Adjuvans je látka, která zvyšuje nebo moduluje specifickou humorální či buněčnou imunitní odpověď proti antigenu, a tak hlavní funkční kritérium běžně používané pro hodnocení různých nových adjuvans zahrnuje jejich schopnost stimulovat buňky imunitního systému. Liposom slouží jako nosič těchto adjuvantních látek. V případě vakcinačního konstruktů obsahujícího nejen adjuvans, ale i specifický antigen, je také tento antigen navázán na liposomální nosič.

Pro testování stimulace aktivity inflamasomu NLRP3 k produkci prozánětlivých cytokinů byly použity čisté liposomy, liposomy s MT05, liposomy s mananem a liposomy obsahující obě látky. Buňky THP1 Null Cells byly nejprve vystaveny účinku LPS (1. signál) a poté byly po dobu 48 hodin inkubovány s liposomálními látkami o koncentracích 30, 75, 150 a 300 μM (2. signál). Negativní kontrolou jsou THP1 Null Cells buňky, které byly vystaveny jen LPS, ale už ne liposomálním preparátům. Buňky ošetřené LPS i ATP jsou kontrolou pozitivní, protože ATP je silným stimulem NLRP3.

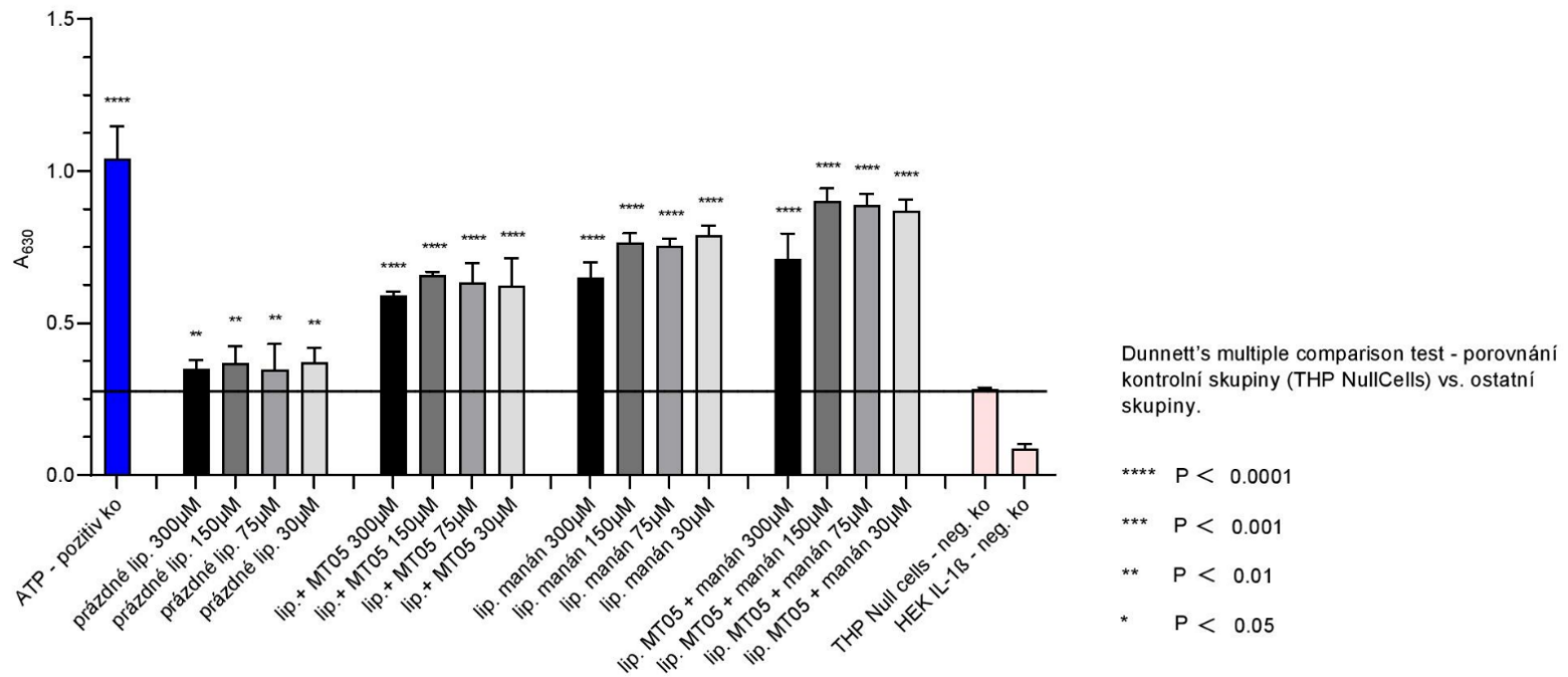
Výsledky studie shrnuje Obr. 32. Základním parametrem hodnocení je hodnota absorbance negativní kontroly (THP1 buněk). Znamená to tedy, že všechny hodnoty nad touto hranicí jsou způsobeny účinky látek navázaných na liposomy.

Manan i MT05 (modifikovaný muramyldipeptid) patří mezi zástupce PAMP rozpoznávané různými povrchovými receptory exprimovanými antigen prezentujícími imunitními buňkami a u obou zmíněných látek byla už adjuvantní aktivita prokázána. Studie J. Turánka et al. potvrzuje vysoký adjuvantní účinek MT05 srovnatelný nebo lepší než samotný nemodifikovaný muramyldipeptid MDP, ale modifikované MT05 se navíc ukázalo jako nepyrogní

a bezpečné.⁶³ Stejně tak i manosylované liposomy ve studii Li-Ping Tseng et al. byly podrobeny testování na kuřatech a bylo potvrzeno zvýšení adaptivní imunitní odpovědi.⁶⁴

Výše zmíněné závěry potvrzují i výsledky našeho testování. Z přiloženého grafu vyplývá, že všechny typy námi připravených liposomálních preparátů mají schopnost aktivovat inflamasom NLRP3, v menší míře aktivují inflamasom i prázdné liposomy. Manosylované liposomy vykazují oproti těm připraveným s látkou MT05 mírně lepší schopnost aktivovat inflamasom k produkci cytokinů. Nejvyšší stimulační účinek mají pak liposomy kombinující obě adjuvans. Z grafu lze také vyčíst to, že nejvyšší koncentrací, která ještě negativně neovlivňuje buňky je 150 μ M. U 300 μ M koncentrace je stimulační účinek také patrný, ale nižší hodnoty absorbance mohou poukazovat na nižší viabilitu buněk. Nicméně u všech koncentrací a typů modifikovaných liposomů dosahuje P-hodnota, která udává mezní hladinu významnosti testu, hodnot velice blízkých nule (menší než 0,0001, znázorněno jako 4 hvězdičky) a znamená to, že ve všech případech je stimulace aktivity inflamasomu statisticky významná.

THP1 Null Cells (9. pasáž) + testované látky
 (prázdné lip., lip. MT05, lip. manan, lip MT05+manan v koncentracích 300 μ M, 150 μ M, 75 μ M, 30 μ M)
 Expozice látek - 48 hod.
 HEK-Blue™ IL-1 β cells (9. pasáž), expozice supernatantu z THP1-Null cells - 48 hodin



Obr. 32 Výsledky testování aktivace inflamasomu NLRP3 různými typy liposomů přidaných v koncentracích 30, 75, 150 a 300 μ M po 48 h expozici.

5 ZÁVĚR

Liposomy jsou díky svým vlastnostem obecně považovány za materiál vhodný k použití v biomedicínských aplikacích. V této diplomové práci byly metodou hydratace lipidového filmu připraveny nanoliposomy, které byly s využitím metody klik chemie, konkrétně oximové ligace, povrchově modifikovány biokompatibilním polysacharidem mananem. Připravené nanočástice byly charakterizovány řadou pokročilých fyzikálně-chemických metod a také byla zkoumána jejich schopnost stimulovat buňky imunitního systému *in vitro*.

Snímky z transmisního elektronového mikroskopu prokázaly pravidelný sférický tvar liposomů s patrnou vrstvou povrchově vázaného mananu, kterou dokládá i provedená FT-IR analýza. Velikost liposomů byla zjišťována metodou DLS; u každého typu liposomů se podařilo připravit stabilní disperzi bez znatelných agregátů s úzkou velikostní distribucí.

Dále se prováděla *in vitro* studie na buněčné linii THP1 Null Cells pro ověření, zda připravené liposomální látky aktivují inflamason NLRP3 k produkci prozánětlivých cytokinů jako je například IL-1 β . Její výsledky dokazují, že připravené liposomy jsou schopny ve velké míře stimulovat inflamason a jsou tedy potenciálně vhodné pro konstrukci nosičů vakcín s adjuvantními účinky.

Další studie *in vivo* na imunizačních modelech (myš, sele) budou zaměřeny na průkaz imunogenicity rekombinantních antigenů pro konstrukci rekombinantních vakcín. Tato práce je prvním krokem k vytyčenému cíli, kterým jsou rekombinantní vakcíny na bázi liposomálních nosičů a rekombinantních antigenů s využitím metod klik chemie.

REFERENCE

1. Bozzuto, G. & Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 975–999 (2015).
2. Arumugam, S. & Watanabe, K. *Drug Delivery Aspects of Herbal Medicines / Chapter-15*. (2017).
3. Sercombe, L. *et al.* Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front. Pharmacol.* **6**, 1–13 (2015).
4. Li, J. *et al.* A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Sci.* **10**, 81–98 (2015).
5. Marqués-Gallego, P. & De Kroon, A. I. P. M. Ligation strategies for targeting liposomal nanocarriers. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
6. Pandey, H., Rani, R. & Agarwal, V. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Liposome and Their Applications in Cancer Therapy Human & Animal Health. *Arch. Biol. Technol. v. Arch. Biol. Technol. v* **5959**, 16150477–16150477 (2016).
7. Bitounis, D., Fanciullino, R., Iliadis, A. & Ciccolini, J. Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. *ISRN Pharm.* **2012**, 1–11 (2012).
8. Yeagle, P. L., Albert, A. D., Boesze-Battaglia, K., Young, J. & Frye, J. Cholesterol dynamics in membranes. *Biophys. J.* **57**, 413–424 (1990).
9. Akhavan, S., Assadpour, E., Katouzian, I. & Jafari, S. M. Lipid nano scale cargos for the protection and delivery of food bioactive ingredients and nutraceuticals. *Trends Food Sci. Technol.* **74**, 132–146 (2018).
10. Allen, T. M. & Cullis, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 36–48 (2013).
11. Altaf, S. *et al.* Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation LIPOSOMES : AN OVERVIEW. *J. Pharm. Sci. Innov.* **1**, 13–21 (2012).
12. Akbarzadeh, A. *et al.* Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 1 (2013).
13. Zarrabi, A. *et al.* Nanoliposomes and tocosomes as multifunctional nanocarriers for the encapsulation of nutraceutical and dietary molecules. *Molecules* **25**, (2020).
14. Ganesan, P., Karthivashan, G., Park, S. Y., Kim, J. & Choi, D. K. Microfluidization trends in the development of nanodelivery systems and applications in chronic disease treatments. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 6109–6121 (2018).
15. Pauli, G., Tang, W. L. & Li, S. D. Development and characterization of the solvent-assisted active loading technology (SALT) for liposomal loading of poorly water-soluble compounds. *Pharmaceutics* **11**, (2019).
16. Popovska, O., Simonovska, J., Kavrovski, Z. & Rafajlovska, V. International Journal of Pharmaceutical and An Overview : Methods for Preparation and Characterization of Liposomes as Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm. Phytopharm. Res.* **3**, 182–189 (2013).

17. Channarong, S., Chaicumpa, W., Sinchaipanid, N. & Mitrevej, A. Development and evaluation of chitosan-coated liposomes for oral DNA vaccine: The improvement of Peyer's patch targeting using a polyplex-loaded liposomes. *AAPS PharmSciTech* **12**, 192–200 (2011).
18. Chanda, H., Das, P., Chakraborty, R. & Ghosh, A. Original Research Article JPBMS JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL SCIENCES Development and Evaluation of Liposomes of Fluconazole Introduction : Materials and methods : **05**, 1–9 (2011).
19. Kesharwani, P., Md, S., Alhakamy, N. A., Hosny, K. M. & Haque, A. Qbd enabled azacitidine loaded liposomal nanoformulation and its in vitro evaluation. *Polymers (Basel)*. **13**, 1–18 (2021).
20. Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J. & Papahadjopoulos, D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *BBA - Biomembr.* **557**, 9–23 (1979).
21. Hunter, D. G. & Frisken, B. J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. *Biophys. J.* **74**, 2996–3002 (1998).
22. Ong, S. G. M., Chitneni, M., Lee, K. S., Ming, L. C. & Yuen, K. H. Evaluation of extrusion technique for nanosizing liposomes. *Pharmaceutics* **8**, 1–12 (2016).
23. Wagner, A. & Voraueh-Uhl, K. Liposome Technology for Industrial Purposes. *J. Drug Deliv.* **2011**, 1–9 (2011).
24. Dikpati, A. *et al.* Residual Solvents in Nanomedicine and Lipid-Based Drug Delivery Systems: a Case Study to Better Understand Processes. *Pharm. Res.* **37**, (2020).
25. Salunkhe, S., Pagar, U., Bhatia, N. & Thorat, J. Benchmark in the era of drug carriers for semisolid based topical delivery system. *Am. J. PharmTech Res.* **3**, 493–510 (2013).
26. Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X. & Low, S. C. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 1–14 (2013).
27. Choudhary, R. C., Kumari, S., Kumaraswamy, R. V & Pal, A. Characterization Methods for Chitosan- Based Nanomaterials Chapter 5 Characterization Methods for Chitosan- - Based Nanomaterials. (2019) doi:10.1007/978-3-030-12496-0.
28. Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. (Wiley Blackwell, 2004).
29. Klíč, A., Volka, K. & Dubcová, M. *Fourierova transformace s příklady z infračervené spektroskopie*. (2012).
30. Günzler, H. & Williams, A. *Handbook of Analytical Techniques. Handbook of Analytical Techniques* vols 1–2 (Wiley, 2001).
31. Tian, Y. *et al.* Protein Profiling and Sizing of Extracellular Vesicles from Colorectal Cancer Patients via Flow Cytometry. *ACS Nano* **12**, 671–680 (2018).
32. Van Der Pol, E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., Nieuwland, R. & Van Leeuwen, T. G. Refractive index determination of nanoparticles in suspension using nanoparticle tracking analysis. *Nano Lett.* **14**, 6195–6201 (2014).
33. Nanofcm. Nanomedicine. <https://www.nanofcm.com/nanomedicine/> (2021).

34. Yasar Yildiz, S. & Toksoy Oner, E. Mannan as a Promising Bioactive Material for Drug Nanocarrier Systems. *Appl. Nanotechnol. Drug Deliv.* (2014) doi:10.5772/58413.
35. Chauhan, P. S., Puri, N., Sharma, P. & Gupta, N. Mannanases: Microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1817–1830 (2012).
36. Moreira, L. R. S. & Filho, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**, 165–178 (2008).
37. Mikkonen, K. S. & Tenkanen, M. Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: Xylans and mannans. *Trends Food Sci. Technol.* **28**, 90–102 (2012).
38. Pashov, A., Monzavi-Karbassi, B. & Kieber-Emmons, T. Glycan-mediated immune responses to tumor cells. *Hum. Vaccin.* **7**, 156–165 (2011).
39. Bartheldyová, E. *et al.* N-Oxy lipid-based click chemistry for orthogonal coupling of mannan onto nanoliposomes prepared by microfluidic mixing: Synthesis of lipids, characterisation of mannan-coated nanoliposomes and in vitro stimulation of dendritic cells. *Carbohydr. Polym.* **207**, 521–532 (2019).
40. Ulrich, S., Boturn, D., Marra, A., Renaudet, O. & Dumy, P. Oxime ligation: A chemoselective click-type reaction for accessing multifunctional biomolecular constructs. *Chem. - A Eur. J.* **20**, 34–41 (2014).
41. Bartheldyová, E. *et al.* Hyaluronic Acid Surface Modified Liposomes Prepared via Orthogonal Aminoxy Coupling: Synthesis of Nontoxic Aminoxylipids Based on Symmetrically α -Branched Fatty Acids, Preparation of Liposomes by Microfluidic Mixing, and Targeting to Cancer Cells Expressi. *Bioconjug. Chem.* **29**, 2343–2356 (2018).
42. Algar, W. R. *et al.* The controlled display of biomolecules on nanoparticles: A challenge suited to bioorthogonal chemistry. *Bioconjug. Chem.* **22**, 825–858 (2011).
43. Bartheldyová, E. *et al.* Mannan-coated nanoliposomes prepared via orthogonal n-oxy lipids-based click chemistry and microfluidic mixing: characterisation of the structure and in vitro biological activities.
44. Yingchoncharoen, P., Kalinowski, D. S. & Richardson, D. R. Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: What is available and what is yet to come. *Pharmacol. Rev.* **68**, 701–787 (2016).
45. Anselmo, A. C. & Mitragotri, S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng. Transl. Med.* **4**, 1–16 (2019).
46. Lila, A. S. A. & Ishida, T. Liposomal delivery systems: Design optimization and current applications. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 1–10 (2017).
47. Xie, X. *et al.* Challenges and Opportunities from Basic Cancer Biology for Nanomedicine for Targeted Drug Delivery. *Curr. Cancer Drug Targets* **19**, 257–276 (2018).
48. Riaz, M. K. *et al.* Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).

49. Degrauwe, N. *et al.* Theranostics in Interventional Oncology: Versatile Carriers for Diagnosis and Targeted Image-Guided Minimally Invasive Procedures. **10**, (2019).
50. Børresen, B. *et al.* Noninvasive molecular imaging of the enhanced permeability and retention effect by⁶⁴Cu-liposomes: In vivo correlations with⁶⁸Ga-RGD, fluid pressure, diffusivity and¹⁸F-FDG. *Int. J. Nanomedicine* **15**, 8571–8581 (2020).
51. Kim, E. & Jeong, H. Liposomes: Biomedical Applications. *Chonnam Med. J.* **57**, 27 (2021).
52. Feng, L. *et al.* Theranostic Liposomes with Hypoxia-Activated Prodrug to Effectively Destruct Hypoxic Tumors Post-Photodynamic Therapy. *ACS Nano* **11**, 927–937 (2017).
53. Wang, N., Chen, M. & Wang, T. Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: From basics to clinical immunization. *J. Control. Release* **303**, 130–150 (2019).
54. Schwendener, R. A. Liposomes as vaccine delivery systems: A review of the recent advances. *Ther. Adv. Vaccines* **2**, 159–182 (2014).
55. KHEMKA, V. *et al.* The Capacity of a Combined Liposomal Hepatitis B and C Vaccine to Stimulate Humoral and Cellular Responses in Mice. *Viral Immunol.* **11**, 73–78 (1998).
56. Adler-Moore, J. *et al.* Characterization of the murine Th2 response to immunization with liposomal M2e influenza vaccine. *Vaccine* **29**, 4460–4468 (2011).
57. Christensen, D., Korsholm, K. S., Andersen, P. & Agger, E. M. Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* **10**, 513–521 (2011).
58. Foged, C. *et al.* Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: Effect of bilayer composition. *Vaccine* **22**, 1903–1913 (2004).
59. Liang, F. *et al.* Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells In Vivo after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques. *Mol. Ther.* **25**, 2635–2647 (2017).
60. Attia, M. A., Essa, E. A., Elebyary, T. T., Faheem, A. M. & Elkordy, A. A. Brief on recent application of liposomal vaccines for lower respiratory tract viral infections: From influenza to covid-19 vaccines. *Pharmaceuticals* **14**, (2021).
61. Samaridou, E., Heyes, J. & Lutwyche, P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **154–155**, 37–63 (2020).
62. Rabyk, M. *et al.* Mannan-based conjugates as a multimodal imaging platform for lymph nodes. *J. Mater. Chem. B* **6**, 2584–2596 (2018).
63. Turánek, J., Mašek, J., Raška, M. & Ledvina, M. Application of Liposomes for Construction of Vaccines. *Biomed. Sci. Eng. Technol.* (2012) doi:10.5772/21328.
64. Tseng, L.-P., Chiou, C.-J., Deng, M.-C., Huang, Y.-Y. & Liu, D.-Z. Internasal delivery of mannan-coated liposomes enhances antibody responses to a Newcastle disease virus vaccine. *Biomed. Eng. Appl. Basis Commun.* **22**, 1–7 (2010).