

MOŽNOSTI TERAPEVTSKE UPORABE NANODELCEV S STRUKTURO TEKOČIH KRISTALOV KOT DOSTAVNIH SISTEMOV ZDRAVILNIH UČINKOVIN THERAPEUTIC POSSIBILITIES OF LIQUID CRYSTALLINE NANOPARTICLES AS DRUG DELIVERY SYSTEMS

AVTORICE / AUTHORS:

asist.-razisk. Monika Prašnikar, mag. farm.

asist. Mercedes Vitek, mag. farm.

doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: mirjam.gosenca.matjaz@ffa.uni-lj.si



POVZETEK

Nanodelci s strukturo tekočih kristalov so termodinamsko stabilni nanodostavni sistemi z urejeno strukturo, ki združujejo lastnosti kristalnih trdnih snovi in tekočin. Njihova edinstvena struktura omogoča vgradnjo hidrofilnih, amfifilnih in hidrofobnih zdravilnih učinkovin. Najpogostejše prednosti vgradnje zdravilnih učinkovin v nanodelce s strukturo tekočih kristalov, ki jih lahko oblikujemo za različne načine aplikacije, so zaščita zdravilne učinkovine, prirejeno sproščanje in izboljšana biološka uporabnost. Za peroralno aplikacijo vgrajujemo zdravilne učinkovine v nanodelce s strukturo tekočih kristalov z namenom izboljšanja absorpcije in biološke uporabnosti slabo topnih zdravilnih učinkovin, zaščite nestabilnih zdravilnih učinkovin ali preprečevanja neželenih učinkov. Pri dermalni uporabi sta izraziti prednosti nanodelcev s strukturo tekočih kristalov prirejeno sproščanje in izboljšana permeabilnost zdravilnih učinkovin v globlje plasti tkiva. Hkrati nanodelci s strukturo tekočih kristalov omogočajo ciljano zdravljenje raka ali bolezni možganov in prinašajo nove priložnosti dostave cepiv in bioloških učinkovin, kot so proteini, peptidi in nukleinske kisline. Preboj teh nanodelcev v klinično uporabo upočasnjuje predvsem nepredvidljiva kinetika sproščanja zdravilnih učinkovin in pomanjkanje biorelevantnih modelov in študij. Kljub temu so nanodelci s strukturo tekočih kristalov raznovrsten dostavni sistem, ki ponuja priložnost za oblikovanje dostopnih in pacientu prijaznih zdravil.

KLJUČNE BESEDE:

heksosomi, kubosomi, metode izdelave, na lipidih osnovani dostavni sistemi, načini aplikacije, nanodelci, tekoči kristali

ABSTRACT

Liquid crystalline nanoparticles are thermodynamically stable nanodelivery systems with an ordered structure, combining the properties of crystalline matter and liquids. Their unique structure enables incorporation of hydrophilic, amphiphilic, and hydrophobic active pharmaceutical ingredients. Their protection, controlled release, and enhanced bioavailability are the most common advantages of liquid crystalline nanoparticles, which can be tai-



lored for various routes of administration. In oral delivery, active pharmaceutical ingredients are incorporated into liquid crystalline nanoparticles to improve their absorption and bioavailability, protect unstable active pharmaceutical ingredients, or prevent their side effects. For dermal application, controlled release and enhanced permeability of active pharmaceutical ingredients into deeper tissue layers are key advantages. Moreover, liquid crystalline nanoparticles enable targeted therapy for cancer and brain diseases and offer new opportunities for the delivery of vaccines and biological active substances such as proteins, peptides, and nucleic acids. However, clinical translation of these nanoparticles is hindered primarily by burst release kinetics and a lack of biorelevant models and studies. Despite these challenges, liquid crystalline nanoparticles represent a versatile delivery platform with the potential to develop accessible and patient-friendly medicines.

KEY WORDS:

administration routes, cubosomes, hexosomes, lipid-based delivery systems, liquid crystals, nanoparticles, preparation methods

1 UVOD

Uporaba nanotehnoloških pristopov pri oblikovanju dostavnih sistemov odpira nove možnosti za učinkovito in k pacientu usmerjeno zdravljenje (1, 2). Med njimi so zanimivi nanodostavni sistemi na osnovi lipidov, med katere uvrščamo nanodelce s strukturo tekočih kristalov (angl. *liquid crystalline nanoparticles*, LCNP). Tekoči kristali predstavljajo vmesno stanje med trdno in tekočo fazo. Sestavljajo jih delno urejeni hidrati ali solvati določenih površinsko aktivnih snovi, ki jih imenujemo mezogeni. Glede na mehanizem nastanka jih delimo na termotropne, ki nastanejo s spremembo temperature, in liotropne, ki nastanejo z dodatkom topila trdni snovi v odvisnosti od razmerja sestavin in drugih pogojev, kot je na primer temperatura (3, 4). Termotropni tekoči kristali se v raziskavah sicer proučujejo kot temperaturno odzivni dostavni sistemi zdravilnih učinkovin, vendar je primarni raziskovalni fokus na področju dostave zdravilnih učinkovin usmerjen v liotropne tekoče kristale (5).

2 NANODELCI S STRUKTURO TEKOČIH KRISTALOV

Kot dostavne sisteme lahko uporabimo liotropne tekoče kristale v tako imenovani obliki »bulk« ali kot disperzijo LCNP. Liotropni tekoči kristali v obliki »bulk« so viskozni sistemi z makroskopskim videzom gela, kjer mezogeni tvorijo trodimenzionalno strukturo tekočih kristalov po celotnem volumnu sistema. Pri tem nastanejo lamelarne, heksagonalne ali kubične mezofaze, med katerimi lahko poteče fazni prehod s spreminjanjem pogojev, kot so sestava, pH in/ali temperatura. V primerjavi z obliko »bulk« večino disperzije LCNP predstavlja disperzni medij, običajno voda ali pufer, v katerem so dispergirani LCNP. Ti predstavljajo posamezne enote, katerih notranjost tvorijo mezogeni urejeni v različne mezofaze tekočih kristalov, najpogostejše heksagonalne faze, imenovane heksosomi, ali kubične faze, imenovane kubosomi (slika 1). Za razliko od oblike »bulk« je viskoznost disperzije LCNP zaradi visokega deleža disperznega medija nizka, prav tako je potrebna stabilizacija s površinsko aktivnimi snovmi, ki obdajajo nanodelce in preprečujejo njihovo združevanje (6). Kubosomi tvorijo kompleksno tridimenzionalno struk-

SLOVAR

Tekoči kristali: snovi, ki imajo lastnosti kristalnih trdnih snovi (urejenost, anizotropnost, dvolumnost, mehanska stabilnost) in tekočin (tok).

Liotropni tekoči kristali: tekoči kristali, ki jih tvorijo površinsko aktivne snovi v topilu.

Termotropni tekoči kristali: tekoči kristali, ki nastanejo s segrevanjem trdnih snovi.

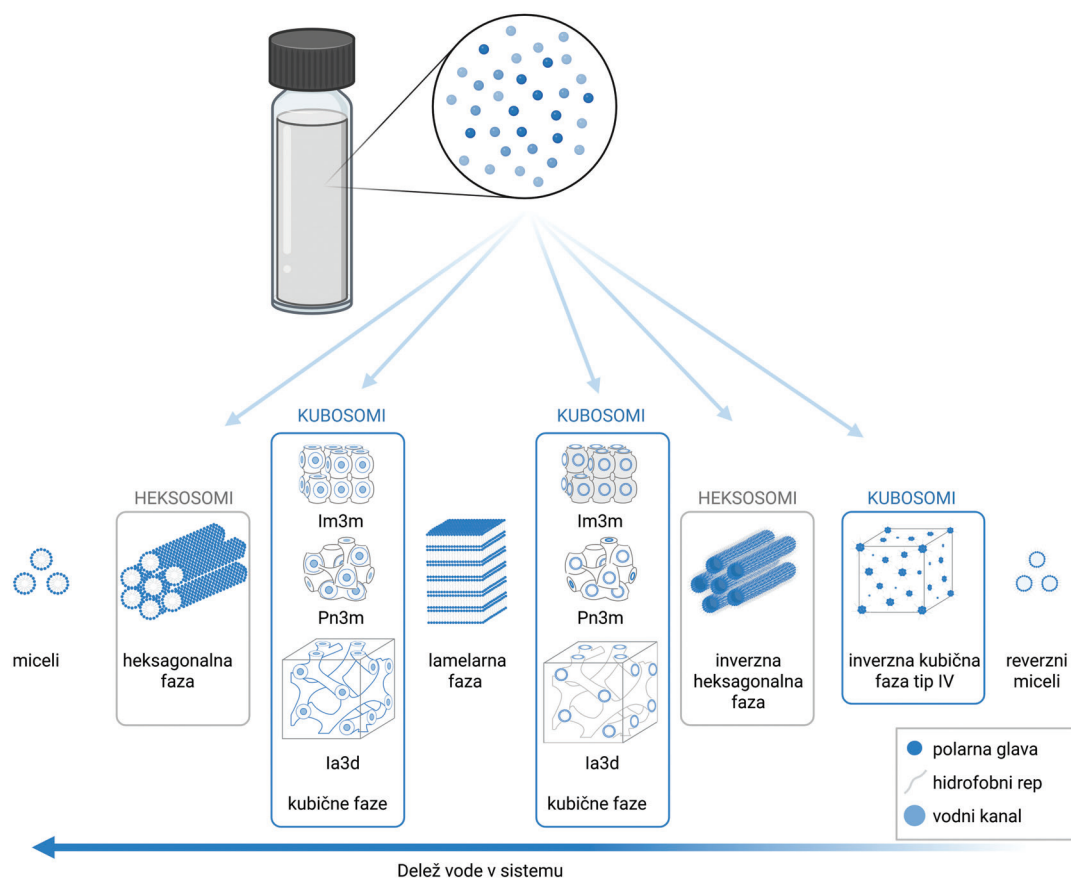
Mezofaze: različne oblike urejenosti molekul v tekočih kristalih, ki se med seboj razlikujejo po optičnih in drugih lastnostih (npr. kubične, heksagonalne, lamelarne mezofaze). Med njimi lahko pri spremembi pogojev poteče fazni prehod.

Mezogen: molekula, ki tvori tekoče kristale.

Nanodelci s strukturo tekočih kristalov (LCNP): termodinamsko stabilni nanodelci z jedrom iz tekočih kristalov, obdanim z ovojem stabilizatorja (npr. kubosomi, heksosomi), ki združujejo prednosti nanodelcev (npr. velika specifična površina) in tekočih kristalov (spontan nastanek, urejenost, anizotropnost) (3, 82).

turo iz neprekinjenega ukrivljenega lipidnega dvosloja debeline $\sim 3,5$ nm in vodnih kanalov s premerom ~ 5 nm z različnimi simetrijami. V odvisnosti od strukture pod kubične faze spada več različnih ureditev mezogenov imenovanih Im3m, Pn3m ali Ia3d, ki lahko sestavljajo notranjo strukturo kubosomov (7, 8). Heksosomi pa imajo cilindrično dvodimenzionalno strukturo šestkotnih oblik z gosto zloženimi vodnimi kanali. Hitrost sproščanja zdravilnih učinkovin iz LCNP je odvisna od notranje strukture oziroma mezofaze nanodelcev in značilnosti zdravilne učinkovine. Hidrofobne zdravilne učinkovine prehajajo lipidne dvosloje dostavnega sistema z difuzijo, zato njihovo hitrost sproš-

čanja določa porazdelitveni koeficient zdravilne učinkovine. Hidrofilne molekule pa difundirajo le po vodnih kanalih, zato je sproščanje teh počasnejše iz heksosomov, kjer vodni kanali medsebojno niso povezani, v primerjavi s kubosomi, kjer so vodni kanali povezani (9). Hitrost sproščanja je odvisna tudi od velikosti molekule zdravilne učinkovine, pri čemer se manjše zdravilne učinkovine sproščajo hitreje. Zanimivo je, da se v kubosome lahko vgrajujejo proteinske molekule, ki so večje od premera vodnih kanalov (~ 5 nm). To bi lahko bila posledica fleksibilnosti kubične faze, ki omogoča premikanje molekul skozi vodne kanale in prehodno tvorbo večjih prostorov, po katerih se



Slika 1: Različne mezofaze spontane organizacije mezogenov glede na delež vode v sistemu. Nanodelci s strukturo tekočih kristalov se imenujejo kubosomi, kadar imajo notranjo strukturo kubičnih faz (Im3m, Pn3m ali Ia3d ali inverzna kubična faza IV), oziroma heksosomi, če izkazujejo heksagonalne faze (heksagonalno ali inverzno heksagonalno) (3, 10, 11). Slika je narejena s pomočjo programa BioRender. <https://BioRender.com/l64z434>.

Figure 1: Liquid crystal mesophases that mesogens can form based on water content in the system. Liquid crystalline nanoparticles are referred to as cubosomes or hexosomes, when their internal structure corresponds to a cubic phase (Im3m, Pn3m ali Ia3d or the inverse cubic phase type IV) or a hexagonal phase (hexagonal or inverse hexagonal phase), respectively (3, 10, 11). Created in BioRender. <https://BioRender.com/l64z434>.

molekula premika, podobno peristaltiki. Sproščanje večjih molekul, predvsem bioloških, je posledično močno upočasnjeno, na primer v raziskavah se je v 3 tednih iz kubsomov sprostilo manj kot 12 % ovalbumina (42,7 kDa) in ovotransferina (75,8 kDa) (7).

Zaradi svoje lipidne sestave in urejene strukture LCNP posnemajo biološke membrane, pri čemer jih odlikuje visoko razmerje med površino in volumnom, številni vodni kanali in termodinamska stabilnost, pri čemer je za slednjo pomembna predvsem zadostna količina disperznega

Preglednica 1: Osnovne sestavine nanodelcev s strukturo tekočih kristalov kot dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin in funkcionalne sestavine, ki prispevajo k vgradnji, tarčni dostavi ali prirejenemu sproščanju oziroma delovanju vgrajene zdravilne učinkovine.
Table 1: Basic components of liquid crystalline nanoparticles as drug delivery systems and functional components that contribute to drug encapsulation, targeted delivery, controlled release or activity.

Vrsta sestavine	Vloga	Sestavine	Reference
Lipidi	Tvorilci tekočih kristalov	Glicerilmonooleat Fitantriol Fosfolipidi Monogliceridi linolne, stearinske, dokozaheksaenojske, eikozapentaenojske ali heptadekaenojske kisline DOPE Glicerilmonooleileter Monoelaidin Fosfatidiletanolamin Oleoiletanolamin PEG-ilirani fosfolipidi Glikolipidi	(10, 11, 15, 16)
Površinsko aktivne snovi	Fizikalna stabilizacija disperzije	Poloksamer 407 Poloksamer 188 Polisorbat 80 Cremophor EL Soli žolčnih kislin Propoksilat Procetyl®	(11, 19–21)
Ostalo	Podaljšan čas zadrževanja v krvnem obtoku Preprečevanje opsonizacije	PEG-ilirani lipidi (npr. DSPE-PEG2000)	(10)
	Mukoadhezivnost	Hitosan	(19)
	Prirejeno sproščanje zdravilne učinkovine	Hialuronska kislina Hitosan	(22)
	Vgradnja siRNA, mRNA, DNA	Kationski lipidi (npr. DOTAP, DDAB, razvejan poli(etilenimin))	(11)
	Tarčno zdravljenje (tumorji, možgani)	Folna kislina Peptidi, ki izboljšajo privzem v celice (D4, TAT) Laktoferin Monoklonska protitelesa	(11, 23, 24)
	Izboljšan prehod krvno-možganske bariere	Lektin, ki se veže na olfaktorno sluznico (angl. <i>odorranalectin</i>)	(25)

DOPE – dioleoilfosfatidiletanolamin, PEG – polietilenglikol, DSPE-PEG – 1, 2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin-poli(etilen glikol), DOTAP – 1,2 dioleoiloksi 3 (trimetilamonijev) propan, DDAB – didecildimetilamonijev bromid.

medija (12). Za razliko od liposomov, ki v celice vstopajo z endocitozo, lahko LCNP zaradi negativne ukrivljenosti membrane tvorijo več interakcij s celično membrano in se z njo tudi zlijejo, kar omogoča izboljššan privzem LCNP v primerjavi z liposomi. Hkrati pa je zlivanje z membrano vzrok za potencialno toksičnost LCNP, saj se lipidi zaradi zlivanja z membrano vanjo vgradijo in lahko porušijo njeno strukturo in v membrani tvorijo pore (13, 14).

Osnovni gradniki oziroma mezogeni v LCNP so amfifilni lipidi, gliceril monooleat (GMO) in fitantriol. V raziskavah so bili uporabljeni tudi fosfolipidi, monogliceridi drugih maščobnih kislin (linolne, stearinske, dokozaheksaenojske, eikozapentaenojske), glicerilmonooleileter, monoelaidin, fosfatidiletanolamin, oleoiletanolamin, glikolipidi in fosfolipidi z vezanimi verigami polietilenglikola (11, 15, 16). GMO je najpogostejše uporabljen lipid zaradi svoje biokompatibilnosti in biorazgradljivosti, vendar je občutljiv na oksidacijo in hidrolizo, kar lahko vpliva na stabilnost nanodelcev po aplikaciji in dolgoročno stabilnost disperzije LCNP (6). Deluje šibko hemolitično, zato moramo posebno pozornost nameniti varnosti parenteralnih formulacij z GMO (17). Fitantriol je sicer odporen na hidrolizo, vendar draži kožo, zato kot pomožna snov v zdravilih ni priporočljiv v koncentracijah višjih od 3 % (18). Hkrati je toksičnost LCNP odvisna od njihove sestave, pri čemer lipidi z razvejanimi verigami, kot je fitantriol, destabilizirajo celične membrane ob zlivanju z njimi (13, 14).

Za doseganje fizikalne stabilnosti koloidne disperzije nanodelcev so pomembne sestavine LCNP stabilizatorji, kot so poloksamer 407, polisorbit 80 in žolčne kisline (19). Za stabilizacijo LCNP iz GMO in fitantriola se uporablja tudi derivat polietoksietiliranega ricinusovega olja (Cremophor), fizikalno stabilnost LCNP na osnovi fitantriola pa je prav tako mogoče izboljšati z dodatkom polietilenglikol (PEG)-iliranih fitanil kopolimerov (20, 21).

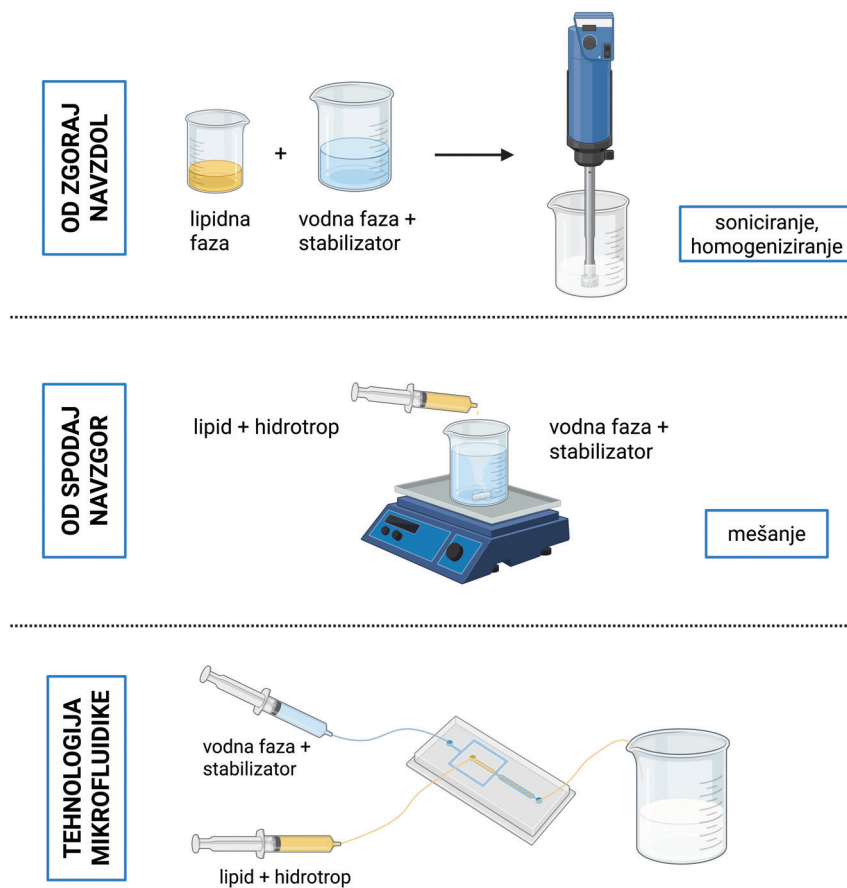
Z optimizacijo sestave in površine LCNP lahko oblikujemo dostavne sisteme, ki so odzivni na različne pogoje, kot so pH, ionska moč, temperatura. Ti dejavniki sprožijo fazni prehod med posameznimi fazami notranje strukture LCNP in posledično prirejeno sproščanje zdravilne učinkovine na tarčnem mestu. Prav tako lahko tarčno dostavo dosežemo s spremembo površine LCNP z različnimi funkcionalnimi sestavinami (preglednica 1). Raziskovalci ta pristop najpogostejše proučujejo za peroralno aplikacijo zdravilnih učinkovin ali v primeru dostave protitumornih zdravilnih učinkovin ter bioloških učinkovin. Dostava slednjih z LCNP je še posebej zanimiva z vidika zaščite zdravilne učinkovine in njenega podaljšanega sproščanja, kar zmanjša pogostost odmerjanja in olajša zdravljenje (11).

3 METODE IZDELAVE NANODELCEV S STRUKTURO TEKOČIH KRISTALOV

Metode izdelave LCNP temeljijo na dveh glavnih pristopih, in sicer 1) »od zgoraj navzdol« (angl. *top-down*) z dispergiranjem liotropnih tekočih kristalov (v obliki »bulk«) z visoko-energijskimi metodami, 2) »od spodaj navzgor« (angl. *bottom-up*) s spontanim oblikovanjem LCNP ob vnosu manjše količine energije (6) in 3) s tehnologijo mikrofuidike, ki omogoča natančen nadzor procesnih parametrov (11). Shematičen prikaz metod izdelave LCNP je podan na sliki 2.

Metoda »od zgoraj navzdol«: V okviru te metode najprej združimo lipidno fazo z vodno fazo, s čimer spodbudimo samourejanje lipidnih molekul in nastanek tekočih kristalov v obliki »bulk« (6). Po združitvi lipidne in vodne faze počakamo, da nastanejo tekoči kristali v obliki »bulk« po celotnem volumnu disperzije, najpogostejše pa neposredno po združitvi obeh faz sočasno z nastankom oblike »bulk« poteka njihovo dispergiranje v LCNP z uporabo visokoenergijskih metod, kot so soniciranje in visokostrižna ali visokotlačna homogenizacija. Za optimizacijo procesa izdelave LCNP ali povečanja učinkovitosti vgrajevanja zdravilne učinkovine lahko obe fazi pred združitvijo segrejemo, kar imenujemo emulzijska metoda. Za raztapljanje zdravilne učinkovine v lipidni fazi so pogosto potrebna tudi organska topila, kot so kloroform, etanol ali tetrahidrofuran, ki jih pred mešanjem z vodno fazo odparimo. Ta pristop omogoča tvorbo nanodelcev z nadzorovano velikostjo in ozko porazdelitvijo velikosti (indeks polidisperznosti 0,1–0,4), vendar ni primeren za vgradnjo zdravilnih učinkovin, občutljivih na visoko temperaturo ali mehanski stres, ali za izdelavo LCNP na večji proizvodni skali (6, 11).

Metoda »od spodaj navzgor«: Inovativno nizkoenergijsko metodo, pri kateri je ključna uporaba hidrotropa, so razvili Spicer in sodelavci in običajno poteka s kapljanjem lipidne faze v vodno fazo ali obratno med mešanjem na magnetnem mešalu (26). Pri tej metodi hidrotrop omogoča solubilizacijo molekul mezogena, ki ob mešanju tvorijo nukleacijska jedra v vodni fazi, iz katerih spontano nastanejo nanodelci. Primerni hidrotropi so etanol, PEG ali propilenglikol, hkrati pa so za tvorbo nanodelcev s samozdruževanjem lipidov ključni tudi specifični pogoji (razmerje sestavin, temperatura). Prednost metode »od spodaj navzgor« je izogib tvorbi tekočih kristalov v viskozni obliki »bulk« in vnos manjše količine energije, zato je zlasti primerna za nestabilne zdravilne učinkovine, kot so biološke učinkovine.



Slika 2: Metode izdelave nanodelcev s strukturo tekočih kristalov (6, 11, 19). Slika je narejena s pomočjo programa BioRender. <https://BioRender.com/k14o693>.

Figure 2: Methods for the preparation of liquid crystalline nanoparticles (6, 11, 19). Created in BioRender. <https://BioRender.com/k14o693>.

Ta metoda omogoča izdelavo LCNP na večji skali in je okolju prijazna trajnostna metoda. Omejitve pa predstavljajo daljši čas, ki je potreben za vzpostavitev strukture LCNP, možnost zaostanka organskih topil in širša porazdelitev velikosti, zato je v nekaterih primerih potrebno dodatno soniciranje ali homogenizacija (6).

Tehnologija mikrofluidike: Ta metoda omogoča natančen nadzor nad procesom mešanja lipidne in vodne faze v mikrokanalih in kontinuirano proizvodnjo LCNP. Pri tem nastanejo homogene disperzije LCNP z ozko porazdelitvijo velikosti. Ta metoda je stroškovno učinkovitejša in omogoča hitrejšo izdelavo LCNP v primerjavi s prej omenjenima metodama, predvsem pa omogoča nadzor nad velikostjo in porazdelitvijo velikosti LCNP (27, 28). Za medprocesno spremljanje strukture nastalih nanodelcev s tehnologijo mikrofluidike je v razvoju sklopljena metoda ozkokotnega rentgenskega sipanja (28).

Z nadaljnjimi postopki, kot sta sušenje z razprševanjem ali sušenje z zamrzovanjem, lahko LCNP pretvorimo v trdno obliko predvsem pri oblikovanju formulacij za nanos na nosno sluznico ali v pljuča (29).

4 NAČINI APLIKACIJE NANODELCEV S STRUKTURO TEKOČIH KRISTALOV

LCNP se proučujejo za različne vrste aplikacij (slika 3) (6, 30–39). Glede na način aplikacije LCNP kot nanodostavni sistemi za zdravilne učinkovine izkazujejo različne prednosti, med katerimi izstopa predvsem izboljšana biološka uporabnost vgrajene učinkovine. Hkrati je za LCNP značilen učinek povečane prepustnosti in zadr-

ževanja, kar lahko izkoriščamo za tarčno zdravljenje tumorjev (6).

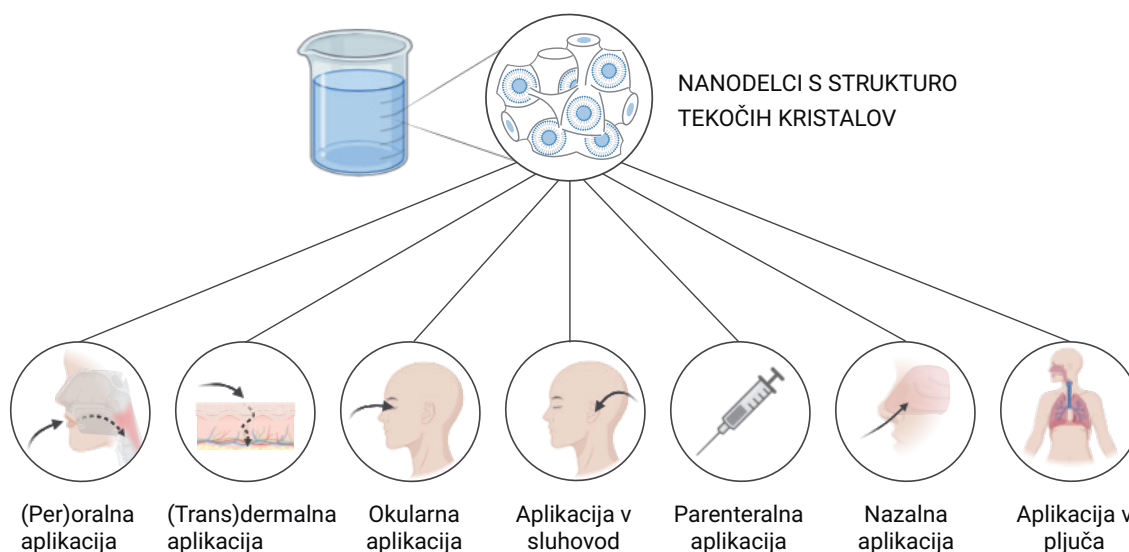
4.1 (PER)ORALNA APLIKACIJA

Ključna prednost peroralne in oralne aplikacije zdravilnih učinkovin, vgrajenih v LCNP, je izboljšana biološka uporabnost, ki temelji na različnih dejavnikih. Poleg zaščite zdravilne učinkovine pred vplivi prebavnega trakta je pomembna lastnost LCNP tudi bioadhezivnost zaradi sposobnosti privzema vode in dehidracije sluznic, kar vodi v mukoadhezijo. Hkrati struktura LCNP omogoča olajšano zlivanje z membrano in dostavo zdravilnih učinkovin z endocitozo, posredovano s klatrini, kaveolini ali lipidnimi rafti (6, 32, 40, 41). Zaradi podobnosti biološkim membranam LCNP solubilizirajo slabo topne zdravilne učinkovine, kot je na primer ciklosporin A, ter izboljšajo njihovo absorpcijo oziroma prikritje okus (30, 31, 42). Vgradnja slabo topnih protitumornih zdravilnih učinkovin v LCNP, na primer paklitaksela in doksorubicina, poleg izboljšane biološke uporabnosti omogoča tudi manjšo pojavnost neželenih učinkov (30, 41, 6). Zaradi teh lastnosti so raziskave na področju LCNP usmerjene tudi v peroralno aplikacijo bioloških učinkovin, na primer inzulina ali protimikrobnih peptidov AP114, DPK-060 in LL-37, ki se trenutno večinoma aplicirajo parenteralno (11). Pri tem je pomembna izbira gradnikov za tvorbo LCNP za peroralno aplikacijo,

saj se GMO in estri maščobnih kislin lahko razgradijo ob prisotnosti lipaz v tankem črevesu, medtem ko so fitantriol in etrski derivati stabilni (6).

4.2 (TRANS)DERMALNA APLIKACIJA

Številne raziskave obsegajo dostavo zdravilnih učinkovin ali skozi kožo s pomočjo tekočih kristalov, ki v roženi plasti kože tvorijo depo obliko, iz katere se sprošča zdravilna učinkovina v globlje plasti kože. Tekoči kristali v obliki »bulk« so zaradi visoke viskoznosti in konsistence gela neposredno primerni za nanos na kožo, kljub nižji viskoznosti pa se za dermalno aplikacijo uporabljajo tudi disperzije LCNP (6, 32, 33). Pomembna prednost tekočih kristalov in njihovih disperzij je sestava teh sistemov, saj običajno vsebujejo GMO in oleinsko kislino (pogosto prisotno kot nečistoto GMO), ki delujeta kot pospeševalca penetracije ter povečata obseg dostave zdravilne učinkovine v globlje plasti kože (43). Disperzije LCNP so raziskovalci uporabili za zdravljenje aken, pri čemer so pri vgradnji zdravilnih učinkovin, kot je azelainska kislina, dokazali prirejeno sproščanje, izboljšano terapevtsko učinkovitost in manj draženja kože ter sistemskih neželenih učinkov (44). Podobno so raziskovalci ugotovili tudi pri vgradnji drugih zdravilnih učinkovin v LCNP, na primer protivnetne zdravilne učinkovine diklofenaka, protiglivične zdravilne učinkovine lulikonazola ter apre-



Slika 3: Proučevani načini aplikacije nanodelcev s strukturo tekočih kristalov. Slika je narejena s pomočjo programa BioRender, <https://BioRender.com/b27n791>.

Figure 3: Explored administration routes for liquid crystalline nanoparticles in research. Created in BioRender. <https://BioRender.com/b27n79>.

milasta za zdravljenje luskavice (45–47). LCNP prav tako predstavljajo pomemben pristop k reševanju izzivov, povezanih z odpornostjo na antibiotike, saj omogočajo učinkovito zdravljenje s protimikrobnimi peptidi (npr. LL-37), ki so slabo topni in občutljivi na razgradnjo (48).

Preko tvorbe depo oblike v roženi plasti LCNP omogočajo tudi transdermalno dostavo zdravilnih učinkovin kot alternativo peroralni aplikaciji, s čimer se lahko izognemo neželenim učinkom v gastrointestinalnem traktu. Primer so nesteroidni antirevmatiki, kot sta etodolak za zdravljenje revmatoidnega artritisa in tenoksikam za zdravljenje osteoartritisa, ki povzročajo poškodbe želodčne sluznice (34, 49). Neželeni učinki so pogosti tudi pri imunosupresivnih zdravilnih učinkovinah za zdravljenje kroničnih bolezni, kot sta kolhicin za zdravljenje protina in rapamicin za zdravljenje luskavice (50, 51).

4.3 OKULARNA APLIKACIJA

Po aplikaciji zdravilnih učinkovin na očesno sluznico pride zaradi solzenja, mežikanja in drugih ovir do hitrega odstranjevanja s površine očesa, kar posledično zahteva pogostejše odmerjanje. To lahko naslovimo z vgradnjo zdravilnih učinkovin v LCNP, ki se na očesni sluznici zadržujejo dalj časa zaradi večje viskoznosti disperzije kubosomov in manjše površinske napetosti v primerjavi s suspenzijo ali raztopino zdravilne učinkovine. Hkrati je za nanodelce značilna boljša adhezija v primerjavi z večjimi delci enake sestave, pri LCNP pa je ta lastnost še bolj poudarjena zaradi sposobnosti privzema vode, ki vodi v mukoadhezijo (52, 53). Prirejeno sproščanje so raziskovalci dokazali pri vgradnji latanoprost in beklometazona v LCNP za zdravljenje očesne hipertenzije (12, 35, 36). Vgradnja antibiotika vankomicina v LCNP je povečala penetracijo v očesno tkivo, kar je izrazito izboljšalo učinkovitost zdravljenja bakterijskega keratitisa, pri katerem je značilna penetracija bakterij v globlje plasti roženice, ki jih vankomicin v obliki raztopine ne doseže (54).

4.4 PARENTERALNA APLIKACIJA

Peptidne in proteinske zdravilne učinkovine so nestabilne v prebavnem traktu, zato jih najpogosteje apliciramo parenteralno. Zaradi hitre razgradnje s proteazami v krvi in izločanja skozi ledvice pa imajo peptidi in manjši proteini pogosto kratek razpolovni čas, od nekaj minut do nekaj ur (55). Z vgradnjo teh zdravilnih učinkovin v LCNP lahko podaljšamo njihov razpolovni čas ter zmanjšamo pogostost odmerjanja, kar je pacientu prijaznejše in stroškovno učinkovitejše.

Na primer vgradnja somatostatina v LCNP je razpolovni čas v krvi podgan po intravenski aplikaciji podaljšala iz nekaj minut na več kot eno uro v primerjavi z raztopino zdravilne učinkovine v pufru (56). Omejitev pa je hitro začetno sproščanje zdravilne učinkovine, ki je šibko adsorbirana na površini nanodelcev ali je vgrajena blizu površine in zato lahko relativno hitro difundira iz LCNP, kar lahko vodi do neželenih učinkov (57). Ta fenomen je treba nasloviti tekom razvoja dostavnega sistema ter ga po potrebi omejiti z drugimi pristopi, kot je vgradnja polimera, ki omogoča geliranje *in situ* ali z drugim primernim načinom.

LCNP omogočajo tudi dostavo zdravilnih učinkovin skozi krvno-možgansko pregrado, kar je zaželeno predvsem pri zdravljenju bolezni centralnega živčevja, na primer Alzheimerjeve bolezni, shizofrenije, multiple skleroze in raka. Mohammad in sodelavci so proučili razliko med heksosomi in kubosomi pri dostavi fenitoina v možgane in ugotovili, da kubosomi omogočajo učinkovitejšo dostavo zdravilne učinkovine v možgane v primerjavi s heksosomi (58). Ciljano terapijo glioblastoma v možganih in zmanjšanje sistemske toksičnosti sta nedavno dosegli dve skupini raziskovalcev s površinsko modifikacijo kubosomov s peptidom angiopep-2 (38, 39).

Kubosomi ojačajo odziv imunskega sistema na dostavljen antigen v primerjavi s samim antigenom, kar kaže, da so kubosomi lahko primerni nosilci tudi za cepiva in adjuvante (59). Z vgradnjo ionogenih lipidov lahko oblikujemo pH-odzivne LCNP in tako izboljšamo prehod zdravilnih učinkovin iz endosomov v citosol po privzemu v celico oziroma modificiramo površino LCNP z imunomodulatornimi molekulami in tako dosežemo adjuvantno delovanje (60).

4.5 NAZALNA APLIKACIJA

Poleg prehoda skozi krvno-možgansko pregrado lahko zdravilne učinkovine v možgane z LCNP dostavimo preko nosne sluznice, kar so dokazali Wu in sodelavci, ki so uporabili površinsko modificirane kubosome z mukoadhezivnim peptidom odoranalektinom. V primerjavi z nemodificiranimi kubosomi so ti značilno izboljšali dostavo peptidne zdravilne učinkovine humanina v možgane skozi olfaktorno regijo nosne sluznice in njegovega učinka, najverjetneje zaradi boljše absorpcije kot posledice daljšega časa zadrževanja na sluznici (25). Podobno je podaljšal čas zadrževanja in izboljšal privzem v možgane mogoče doseči z izdelavo disperzije LCNP z donepezilom, ki se aplicira v obliki kapljic za nos in gelira *in situ* (61).

Nazalna aplikacija predstavlja alternativo peroralni aplikaciji, ko ta ni mogoča, na primer med kemoterapijo, ki

povzročča slabost in bruhanje. Z vgradnjo zdravilne učinkovine proti slabosti, granisetrona, v LCNP so raziskovalci ugotovili povečanje biološke uporabnosti in nalaganje granisetrona v možganih. Na ta način se je podaljšal razpolovni čas granisetrona, kar je prispevalo k manj pogostemu odmerjanju in omogočilo hiter nastop učinka (62). Z nazalno aplikacijo se lahko izognemo obsežnemu pred-sistemskemu metabolizmu zdravilnih učinkovin, kot v primeru tizanidina za zdravljenje mišičnih krčev pri multipli sklerozi (63). Pomembno novost so nedavno predstavili Deruyver in sodelavci, ki so za zdravljenje shizofrenije izdelali farmacevtsko obliko za nos v obliki praška za nos s paliperidonom vgrajenim v kubosome. Nazalna aplikacija je pacientom prijaznejša alternativa intramuskularni injekciji, ki je sicer potrebna zaradi slabe topnosti paliperidona. Površino kubosomov so raziskovalci modificirali z mukoadhezivnim hitosanom, in formulacijo pretvorili v trdno obliko s sušenjem z razprševanjem. Pri tem so nastali aglomerati mikro velikosti (mediana premera med 13 in 20 μm), za katere je značilno, da se po aplikaciji zadržijo v nosni votlini. Za potrditev učinkovitosti in varnosti takšnega dostavnega sistema pa so potrebne še raziskave *in vivo* (64).

4.6 APLIKACIJA V PLJUČA

Nanodelci, vključno z LCNP, zaradi majhne velikosti ob vdihovanju lahko dosežejo v alveolarno regijo pljuč in so zato primeren dostavni sistem za aplikacijo zdravilnih učinkovin v pljuča. Trenutno so v raziskavah LCNP z vgrajenimi zdravilnimi učinkovinami za zdravljenje pljučnih bolezni, kot je pljučna fibroza in rak pljuč. Nifuroksazid ima poleg antibiotičnega tudi protivnetno in antifibrotično delovanje, vendar ima zaradi slabe topnosti nizko biološko uporabnost. V raziskavi *in vivo* so ugotovili, da kubosomi z vgrajenim nifuroksazidom v primerjavi s suspenzijo zdravilne učinkovine bolj učinkovito zmanjšajo fibrotične lezije in vnetni odziv v pljučih, saj solubilizirajo zdravilno učinkovino in tako izboljšajo njeno biološko uporabnost (65). LCNP so primerni tudi za dostavo protitumornih zdravilnih učinkovin zaradi izboljšane privzema v rakave celice in manjše pojavnosti neželenih učinkov, kot v primeru dispepsije kubosomov z bedakilinom (66). Izboljšanje aktivnega privzema LCNP v rakave celice lahko dosežemo tudi z modifikacijo površine kubosomov tudi s hondroitin sulfatom in laktoferinom, kot je bilo dokazano v raziskavi *in vivo* na miših, kjer so potrdili zmanjšanje velikosti in števila tumorjev, kar predstavlja velik potencial za neinvazivno in varnejše zdravljenje pljučnega raka v prihodnosti (37, 67).

4.7 OSTALE RAZISKAVE

Za izboljšano dostavo zdravilnih učinkovin proučujejo tudi različne formulacije LCNP, ki še niso opredeljene glede na način aplikacije. LCNP se zelo pogosto pojavljajo v raziskavah za tarčno dostavo protitumornih zdravilnih učinkovin. Poleg učinkovitejše terapije in manjše pojavnosti neželenih učinkov so raziskovalci tarčno zdravljenje tumorjev dosegli z razvojem kubosomov s pH-odzivnim sproščanjem v kislem okolju (pH 5,5–6,5), ki je značilno za tumorje (22, 68). S tem pristopom so na primer izboljšali citotoksično delovanje zdravilnih učinkovin paklitaksela, fluoksetina in sorafeniba, vgrajenih v kubosome (68–70). Aktivno ciljanje rakavih celic z LCNP je mogoče doseči tudi z vezavo specifičnih sestavin za modifikacijo površine, kot je folna kislina, za katero rakave celice izražajo več receptorjev kot zdrave celice, ali z vezavo monoklonskih protiteles za specifično tarčo (11). Zanimiv pristop so predstavili Mokhtar in sodelavci, ki so za zdravljenje raka dojke izdelali kubosome s kombinacijo protitumornih zdravilnih učinkovin. Eksempstan so vgradili v kubosome, nato pa so njihovo površino modificirali s konjugatom laktoferina in metotreksata. Pri tem se je metotreksat, vezan z amidno vezjo, cepil šele v lizosomu rakavih celic, kar je zmanjšalo pojav neželenih učinkov, kubosomi pa so za vstop v rakave celice izkoristili mehanizem aktivnega in pasivnega ciljanja. Laktoferin je poleg aktivnega privzema preko receptorjev spremenil naboj kubosomov v bolj pozitivnega, kar je olajšalo interakcije s celičnimi membranami in pasivni privzem v celice (24). Na področju odpornosti na antibiotike so raziskovalci z modifikacijo površine kubosomov s pozitivnim lipidom 1,2-dioleoiloksi-3-(trimetilamonijev)propan (DOTAP) izboljšali privzem vgrajenega hidrofobnega antibiotika (novobiocina) v Gram-negativne bakterije, ki imajo negativen naboj na površini. Prav tako so kubosomi preprečili vezavo zdravilne učinkovine na serumski albumin in kot dostavni sistem omogočili učinkovito antibiotično delovanje tudi za druge podobne zdravilne učinkovine (71). Pomembno področje raziskav LCNP je tudi dostava zdravilnih učinkovin na osnovi kratke interferenčne RNA (siRNA), ki nevtralizira mRNA in povzroči utišanje genov (72). Zaradi negativnega naboja siRNA ne more prehajati bioloških membran, zato mora dostavni sistem za učinkovito terapijo zagotoviti prehod membran in hkrati zaščititi zdravilno učinkovino v serumu pred razgradnjo ter zagotoviti njen izstop iz endosoma v citosol (73). Za vgradnjo siRNA v liposome, lipidne nanodelce ali LCNP se uporabljajo pozitivno nabiti lipidi, kot so DOTAP in derivati, didecildimetilamonijev bromid, lipofektin, dioleoilfosfatidiletanolamin ali razvejan

poli(etilenimin), ki se vključijo v strukturo nanodelcev in omogočajo vezavo siRNA (74). Ti kationski lipidi lahko zaradi interakcij z negativno nabito celično membrano inducirajo apoptozo in povzročijo neželene učinke. Med naštetimi nanodostavnimi sistemi LCNP zahtevajo nižji delež kationskih lipidov za učinkovito vgradnjo siRNA in so posledično bolj varni. Poleg tega izboljšajo učinkovitost vgrajene siRNA, izraženo kot utišanje genov *in vitro*, najverjetneje zaradi sproščanja zdravilne učinkovine iz endosoma v citosol (75, 76). Vgradnja siRNA v LCNP za dermalno aplikacijo omogoča lokalno modifikacijo izražanja genov v kožnih celicah in zdravljenje različnih bolezni, kot so vitiligo, luskavica, melanom ali alergijske bolezni (77, 78). Za zdravljenje vitiliga so Bentley in sodelavci razvili heksosome s siRNA, ki so zdravilno učinkovino uspešno dostavili v celice, kar je vodilo v manjše izražanje gena za TyRP-1. Opazili so tudi manjšo toksičnost heksosomov v primerjavi s kompleksom siRNA in polielektrolita poli(etilenimin)-a, povezanih z elektrostatskimi interakcijami, kjer polielektrolit lahko interagira s celično membrano in povzroči citotoksične učinke (77, 78). S poli(etilenimin)-om so raziskovalci izdelali tudi formulacijo kubosomov za vgradnjo siRNA in površino kubosomov modificirali s transkripcijskim aktivacijskim peptidom (TAT), ki omogoča aktivni privzem v celice. Kubosomi s peptidom TAT v koži niso penetrirali globlje od spodnjih plasti povrhnjice, izboljšali pa so učinkovitost delovanja, najverjetno zaradi nastanka skupka zdravilne učinkovine s kationskim polimerom in peptidom TAT, ki je prispeval k aktivnemu privzemu v fibroblaste (23).

V razvoju so tudi nove pomožne snovi za vgrajevanje siRNA v LCNP, ki predstavljajo varnejšo alternativo močno pozitivno nabitim molekulam, kot je DOTAP. Raziskovalci so na primer predlagali metalo-kubosome, kjer so poleg GMO uporabili lipidni kompleks s cinkom, cink(II)-bisdipikolilamin (Zn_2BDPA), ki kompleksira molekulo siRNA. Kubosomi iz GMO omogočajo vključevanje lipida Zn_2BDPA in kompleksov tega lipida s siRNA, pri čemer poteče fazni prehod iz diamantne kubične v primitivno kubično mezofazo. Do danes na podlagi raziskav *in vitro* še niso potrdili učinka siRNA in zmanjšanja izražanja genov (79).

Trenutno še ni odobrenih formulacij z LCNP na trgu, je pa podjetje Camurus AB razvilo tehnologijo FluidCrystal® kot platformo s prirejenim sproščanjem različnih zdravilnih učinkovin, ki temelji na tekočih kristalih v obliki »bulk«. Trenutno je na trgu odobreno zdravilo za subkutano aplikacijo buprenorfina za zdravljenje odvisnosti od opioidov, ki omogoča spontan nastanek tekočih kristalov *in situ* ter prirejeno sproščanje vgrajene zdravilne učinkovine v obdobju do enega meseca (80, 81).

5 SKLEP

Edinstvena struktura in lastnosti LCNP izboljšajo biološko uporabnost zdravilnih učinkovin ter njihovo učinkovitost, zato predstavljajo obetaven nanodostavni sistem za dostavo tako sinteznih kot bioloških učinkovin. Kljub temu je potrebno nasloviti še nekaj izzivov LCNP, ki omejujejo njihovo vključitev v klinične študije, v prvi vrsti hitro začetno sproščanje vgrajene zdravilne učinkovine. Ključnega pomena je tudi razvoj biorelevantnih modelov za spremljanje obnašanja LCNP *in vivo*. Ne glede na izzive pa so LCNP raznovrsten in prilagodljiv dostavni sistem, ki kaže možnosti za široko uporabo in napredek na področju razvoja zdravil, ki so stroškovno učinkovitejša in pacientu prijaznejša.

6 IZJAVA

Delo je nastalo v okviru raziskovalnega programa (P1-0189) in raziskovalnega projekta (L1-3160), ki ju je so-financirala Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije.

7 LITERATURA

1. Kristl J. Vpliv nanotehnologije na razvoj zdravil. *Farm vestn.* junij 2012;63(2):67–73.
2. Park K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *J Control Release.* 16. julij 2007;120(1–2):1–3.
3. Gosenca Matjaž M, Gašperlin M. Liquid crystals in pharmacy: structure and physicochemical characterization. *Farmacevtski vestnik.* april 2011;62(1):15–25.
4. Harms M, Müller-Goymann CC. *Drug Delivery: Liquid Crystals. V: Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology, Six Volume Set.* 4. izd. CRC Press; 2013.
5. Govindan I, Paul A, Rama A, Kailas AA, Abutwaike KA, Annadurai T, idr. Mesogenic Architectures for Advanced Drug Delivery: Interrogating Lyotropic and Thermotropic Liquid Crystals. *AAPS PharmSciTech.* 5. december 2024;26(1):6.
6. Chountoules M, Pispas S, Tseti IK, Demetzos C. Lyotropic Liquid Crystalline Nanostructures as Drug Delivery Systems and Vaccine Platforms. *Pharmaceuticals (Basel).* 31. marec 2022;15(4):429.
7. Clogston J, Caffrey M. Controlling release from the lipidic cubic phase. *Amino acids, peptides, proteins and nucleic acids.*

- Journal of Controlled Release*. 20. september 2005;107(1):97–111.
8. Guo C, Wang J, Cao F, Lee RJ, Zhai G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discovery Today*. 1. december 2010;15(23):1032–40.
9. Phan S, Fong WK, Kirby N, Hanley T, Boyd BJ. Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release. *International Journal of Pharmaceutics*. 12. december 2011;421(1):176–82.
10. Blanco-Fernández G, Blanco-Fernandez B, Fernández-Ferreiro A, Otero-Espinar FJ. Lipidic lyotropic liquid crystals: Insights on biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1. marec 2023;313:102867.
11. Vitoria Pupo Silvestrini A, Wender Debiassi B, Garcia Praça F, Vitoria Lopes Badra Bentley M. Progress and challenges of lyotropic liquid crystalline nanoparticles for innovative therapies. *International Journal of Pharmaceutics*. 25. november 2022;628:122299.
12. Barriga HMG, Holme MN, Stevens MM. Cubosomes: The Next Generation of Smart Lipid Nanoparticles? *Angewandte Chemie International Edition*. 2019;58(10):2958–78.
13. Strachan JB, Dyett BP, Nasa Z, Valery C, Conn CE. Toxicity and cellular uptake of lipid nanoparticles possessing different structure and composition. *Journal of Colloid and Interface Science*. 15. september 2020;576:241–51.
14. Yap SL, Yu H, Li S, Drummond CJ, Conn CE, Tran N. Cell interactions with lipid nanoparticles possessing different internal nanostructures: Liposomes, bicontinuous cubosomes, hexosomes, and discontinuous micellar cubosomes. *Journal of Colloid and Interface Science*. 15. februar 2024;656:409–23.
15. Vitek M, Medoš Ž, Lavrič Z, Jeras M, Planinšek O, Pobirk AZ, idr. Highly Biocompatible Lamellar Liquid Crystals Based on Hempseed or Flaxseed Oil with Incorporated Betamethasone Dipropionate: A Bioinspired Multi-Target Dermal Drug Delivery System for Atopic Dermatitis Treatment. *IJN*. 21. december 2024;19:13687–715.
16. Zabara A, Mezzenga R. Controlling molecular transport and sustained drug release in lipid-based liquid crystalline mesophases. *Journal of Controlled Release*. 28. avgust 2014;188:31–43.
17. Ericsson EM, Faxälv L, Weissenrieder A, Askendal A, Lindahl TL, Tengvall P. Glycerol monooleate–blood interactions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1. januar 2009;68(1):20–6.
18. American College of Toxicology. Final Report on the Safety Assessment of Phytantriol. *Int J Toxicol*. januar 2007;26(1_suppl):107–14.
19. Tan C, Hosseini SF, Jafari SM. Cubosomes and Hexosomes as Novel Nanocarriers for Bioactive Compounds. *J Agric Food Chem*. 9. februar 2022;70(5):1423–37.
20. Chong JYT, Mulet X, Keddle DJ, Waddington L, Mudie ST, Boyd BJ, idr. Novel Steric Stabilizers for Lyotropic Liquid Crystalline Nanoparticles: PEGylated-Phytanyl Copolymers. *Langmuir*. 10. marec 2015;31(9):2615–29.
21. Madheswaran T, Baskaran R, Yong CS, Yoo BK. Enhanced Topical Delivery of Finasteride Using Glyceryl Monooleate-Based Liquid Crystalline Nanoparticles Stabilized by Cremophor Surfactants. *AAPS PharmSciTech*. 1. februar 2014;15(1):44–51.
22. Freag MS, Elnaggar YS, Abdelmonsif DA, Abdallah OY. Layer-By-Layer-Coated Lyotropic Liquid Crystalline Nanoparticles for Active Tumor Targeting of Rapamycin. *Nanomedicine*. 1. november 2016;11(22):2975–96.
23. Petrilli R, Eloy JO, Praça FSG, Del Ciampo JO, Fantini M a. C, Fonseca MJV, idr. Liquid Crystalline Nanodispersions Functionalized with Cell-Penetrating Peptides for Topical Delivery of Short-Interfering RNAs: A Proposal for Silencing a Pro-Inflammatory Cytokine in Cutaneous Diseases. *J Biomed Nanotechnol*. maj 2016;12(5):1063–75.
24. Mokhtar S, Khatlab SN, Elkhodairy KA, Teleb M, Bekhit AA, Elzoghby AO, idr. Methotrexate-Lactoferrin Targeted Exemestane Cubosomes for Synergistic Breast Cancer Therapy. *Front Chem*. 22. marec 2022;10:847573.
25. Wu H, Li J, Zhang Q, Yan X, Guo L, Gao X, idr. A novel small Odorranalectin-bearing cubosomes: Preparation, brain delivery and pharmacodynamic study on amyloid- β 25–35-treated rats following intranasal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1. februar 2012;80(2):368–78.
26. Spicer PT, Hayden KL, Lynch ML, Ofori-Boateng A, Burns JL. Novel Process for Producing Cubic Liquid Crystalline Nanoparticles (Cubosomes). *Langmuir*. 1. september 2001;17(19):5748–56.
27. Shepherd SJ, Issadore D, Mitchell MJ. Microfluidic formulation of nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 1. julij 2021;274:120826.
28. Yaghmur A, Ghazal A, Ghazal R, Dimaki M, Svendsen WE. A hydrodynamic flow focusing microfluidic device for the continuous production of hexosomes based on docosahexaenoic acid monoglyceride. *Phys Chem Chem Phys*. 19. junij 2019;21(24):13005–13.
29. Moebus K, Siepmann J, Bodmeier R. Cubic phase-forming dry powders for controlled drug delivery on mucosal surfaces. *Journal of Controlled Release*. 30. januar 2012;157(2):206–15.
30. Zeng N, Gao X, Hu Q, Song Q, Xia H, Liu Z, idr. Lipid-based liquid crystalline nanoparticles as oral drug delivery vehicles for poorly water-soluble drugs: cellular interaction and in vivo absorption. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:3703–18.
31. Lai J, Lu Y, Yin Z, Hu F, Wu W. Pharmacokinetics and enhanced oral bioavailability in beagle dogs of cyclosporine A encapsulated in glyceryl monooleate/poloxamer 407 cubic nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:13–23.
32. Patlolla RR, Desai P, Belay K, Singh M. Translocation of Cell Penetrating Peptide Engrafted Nanoparticles Across Skin Layers. *Biomaterials*. julij 2010;31(21):5598–607.
33. Rapalli VK, Waghule T, Hans N, Mahmood A, Gorantla S, Dubey SK, idr. Insights of lyotropic liquid crystals in topical drug delivery for targeting various skin disorders. *Journal of Molecular Liquids*. 1. oktober 2020;315:113771.
34. Elakkad YE, Younis MK, Allam RM, Mohsen AF, Khalil IA. Tenoxicam loaded hyalucubosomes for osteoarthritis. *International Journal of Pharmaceutics*. 15. maj 2021;601:120483.
35. Bessone CDV, Akhlaghi SP, Tártara LI, Quinteros DA, Loh W, Allemanni DA. Latanoprost-loaded phytantriol cubosomes for the treatment of glaucoma. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1. maj 2021;160:105748.
36. Gaballa SA, El Garhy OH, Moharram H, Abdelkader H. Preparation and Evaluation of Cubosomes/Cubosomal Gels for Ocular Delivery of Beclomethasone Dipropionate for Management of Uveitis. *Pharm Res*. 23. september 2020;37(10):198.
37. Abdelaziz HM, Elzoghby AO, Helmy MW, Samaha MW, Fang JY, Freag MS. Liquid crystalline assembly for potential combinatorial chemo-herbal drug delivery to lung cancer cells. *IJN*. 11. januar 2019;14:499–517.
38. Cai X, Refaat A, Gan PY, Fan B, Yu H, Thang SH, idr. Angiopep-2-Functionalized Lipid Cubosomes for Blood–Brain Barrier Crossing and Glioblastoma Treatment. *ACS Appl Mater Interfaces*. 13. marec 2024;16(10):12161–74.

39. Lin T, Wei Q, Zhang H, Yang Y, Jiang B, Wang Z, idr. Novel dual targeting cubosomes modified with angiopep-2 for co-delivery GNA and PLHSpT to brain glioma. *J Biomater Appl.* 1. januar 2024;38(6):743–57.
40. Rajabalaya R, Musa MN, Kifli N, David SR. Oral and transdermal drug delivery systems: role of lipid-based lyotropic liquid crystals. *DDDT.* 13. februar 2017;11:393–406.
41. Swamakar NK, Thanki K, Jain S. Bicontinuous Cubic Liquid Crystalline Nanoparticles for Oral Delivery of Doxorubicin: Implications on Bioavailability, Therapeutic Efficacy, and Cardiotoxicity. *Pharm Res.* 1. maj 2014;31(5):1219–38.
42. Fan Y, Chen H, Huang Z, Zhu J, Wan F, Peng T, idr. Taste-masking and colloidal-stable cubosomes loaded with Cefpodoxime proxetil for pediatric oral delivery. *International Journal of Pharmaceutics.* 15. februar 2020;575:118875.
43. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev.* 27. marec 2004;56(5):603–18.
44. Gowda CM, Wairkar S. Azelaic acid-based lyotropic liquid crystals gel for acne vulgaris: Formulation optimization, antimicrobial activity and dermatopharmacokinetic study. *International Journal of Pharmaceutics.* 25. december 2024;667:124879.
45. Arias EM, Guiró P, Rodriguez-Abreu C, Solans C, Escribano-Ferrer E, Garcia-Celma MJ. Cubic liquid crystalline structures in diluted, concentrated and highly concentrated emulsions for topical application: Influence on drug release and human skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics.* 5. oktober 2019;569:118531.
46. Mahmood A, Rapalli VK, Waghule T, Gorantla S, Singhvi G. Luliconazole loaded lyotropic liquid crystalline nanoparticles for topical delivery: QbD driven optimization, in-vitro characterization and dermatokinetic assessment. *Chemistry and Physics of Lipids.* 1. januar 2021;234:105028.
47. Rapalli VK, Tomar Y, Sharma S, Roy A, Singhvi G. Apremilast loaded lyotropic liquid crystalline nanoparticles embedded hydrogel for improved permeation and skin retention: An effective approach for psoriasis treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 1. junij 2023;162:114634.
48. Boge L, Hallsténsson K, Ringstad L, Johansson J, Andresson T, Davoudi M, idr. Cubosomes for topical delivery of the antimicrobial peptide LL-37. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 1. januar 2019;134:60–7.
49. Salah S, Mahmoud AA, Kamel AO. Etodolac transdermal cubosomes for the treatment of rheumatoid arthritis: ex vivo permeation and in vivo pharmacokinetic studies. *Drug Delivery.* 1. januar 2017;24(1):846–56.
50. Nasr M, Younes H, Abdel-Rashid RS. Formulation and evaluation of cubosomes containing colchicine for transdermal delivery. *Drug Deliv and Transl Res.* 1. oktober 2020;10(5):1302–13.
51. Ramalheiro A, Paris JL, Silva BFB, Pires LR. Rapidly dissolving microneedles for the delivery of cubosome-like liquid crystalline nanoparticles with sustained release of rapamycin. *International Journal of Pharmaceutics.* 15. december 2020;591:119942.
52. Kocbek P. Nanosuspenzije - aktualni nanotehnoški pristop za izdelavo farmacevtskih oblik s težko topnimi učinkovinami? *Farmaceutski vestnik.* 2016;67(4):296–302.
53. Nielsen LS, Schubert L, Hansen J. Bioadhesive drug delivery systems: I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1. julij 1998;6(3):231–9.
54. Kaul S, Nagaich U, Verma N. Preclinical assessment of nanostructured liquid crystalline particles for the management of bacterial keratitis: in vivo and pharmacokinetics study. *Drug Deliv and Transl Res.* 1. julij 2022;12(7):1719–37.
55. Cao S jun, Lv Z qiang, Guo S, Jiang G ping, Liu H ling. An update - Prolonging the action of protein and peptide drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 1. februar 2021;61:102124.
56. Cervin C, Vandoolaeghe P, Nistor C, Tiberg F, Johnsson M. A combined in vitro and in vivo study on the interactions between somatostatin and lipid-based liquid crystalline drug carriers and bilayers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2. marec 2009;36(4):377–85.
57. Huang X, Brazel CS. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release.* 15. junij 2001;73(2):121–36.
58. Mohammad Y, Prentice RN, Boyd BJ, Rizwan SB. Comparison of cubosomes and hexosomes for the delivery of phenytoin to the brain. *Journal of Colloid and Interface Science.* 1. januar 2022;605:146–54.
59. Rizwan SB, McBurney WT, Young K, Hanley TL, Boyd BJ, Rades T, idr. Cubosomes containing the adjuvants iniquimod and monophosphoryl lipid A stimulate robust cellular and humoral immune responses. *Journal of Controlled Release: The Official journal of the Controlled Release Society, and of the Japan Society of Drug Delivery System.* 2013;165(1):16–21.
60. Liu Z, Yu L, Gu P, Bo R, Xu S, Wusiman A, idr. Surface-Engineered Cubosomes Serve as a Novel Vaccine Adjuvant to Modulate Innate Immunity and Improve Adaptive Immunity in vivo. *Int J Nanomedicine.* 4. november 2020;15:8595–608.
61. Patil RP, Pawara DD, Gudewar CS, Tekade AR. Nanostructured cubosomes in an in situ nasal gel system: an alternative approach for the controlled delivery of donepezil HCl to brain. *Journal of Liposome Research.* 3. julij 2019;29(3):264–73.
62. Eissa EM, Elkomy MH, Eid HM, Ali AA, Abourehab MAS, Alsubaiyel AM, idr. Intranasal Delivery of Granisetron to the Brain via Nanostructured Cubosomes-Based In Situ Gel for Improved Management of Chemotherapy-Induced Emesis. *Pharmaceutics.* 29. junij 2022;14(7):1374.
63. Thakkar H, Modi B, Patel B. Intranasal spray of cubosomal tizanidine hydrochloride for brain targeting: in vitro and in vivo characterisation. *Journal of Microencapsulation.* 4. julij 2023;40(5):366–83.
64. Deruyver L, Rigaut C, Gomez-Perez A, Lambert P, Haut B, Goole J. In vitro Evaluation of Paliperidone Palmitate Loaded Cubosomes Effective for Nasal-to-Brain Delivery. *Int J Nanomedicine.* 1. marec 2023;18:1085–106.
65. Saber S, Nasr M, Kaddah MMY, Mostafa-Hedeab G, Cavalu S, Mourad AAE, idr. Nifuroxazide-loaded cubosomes exhibit an advancement in pulmonary delivery and attenuate bleomycin-induced lung fibrosis by regulating the STAT3 and NF- κ B signaling: A new challenge for unmet therapeutic needs. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 1. april 2022;148:112731.
66. Patil SM, Sawant SS, Kunda NK. Inhalable bedaquiline-loaded cubosomes for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *International Journal of Pharmaceutics.* 25. september 2021;607:121046.
67. Abdelaziz HM, Elzoghby AO, Helmy MW, Abdelfattah EZA, Fang JY, Samaha MW, idr. Inhalable Lactoferrin/Chondroitin-Functionalized Monoolein Nanocomposites for Localized Lung Cancer Targeting. *ACS Biomater Sci Eng.* 10. februar 2020;6(2):1030–42.
68. Cai X, Fan B, Thang SH, Drummond CJ, Tran N, Zhai J. Paclitaxel-loaded cubosome lipid nanocarriers stabilised with pH

- and hydrogen peroxide-responsive steric stabilisers as drug delivery vehicles. *J Mater Chem B*. 4. januar 2023;11(2):403–14.
69. Abdel-Bar HM, Khater SE, Ghorab DM, Al-mahallawi AM. Hexosomes as Efficient Platforms for Possible Fluoxetine Hydrochloride Repurposing with Improved Cytotoxicity against HepG2 Cells. *ACS Omega*. 6. oktober 2020;5(41):26697–709.
 70. Thapa RK, Choi JY, Poudel BK, Hiep TT, Pathak S, Gupta B, idr. Multilayer-Coated Liquid Crystalline Nanoparticles for Effective Sorafenib Delivery to Hepatocellular Carcinoma. *ACS Appl Mater Interfaces*. 16. september 2015;7(36):20360–8.
 71. Dyett BP, Sarkar S, Yu H, Strachan J, Drummond CJ, Conn CE. Overcoming Therapeutic Challenges of Antibiotic Delivery with Cubosome Lipid Nanocarriers. *ACS Appl Mater Interfaces*. 15. maj 2024;16(19):24191–205.
 72. Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci*. avgust 2006;97(8):689–96.
 73. Tan SJ, Kiatwuthinon P, Roh YH, Kahn JS, Luo D. Engineering Nanocarriers for siRNA Delivery. *Small*. 4. april 2011;7(7):841–56.
 74. Bhavsar D, Subramanian K, Sethuraman S, Krishnan UM. Translational siRNA therapeutics using liposomal carriers: prospects & challenges. *Curr Gene Ther*. avgust 2012;12(4):315–32.
 75. Tajik-Ahmadabad B, Mechler A, Muir BW, McLean K, Hinton TM, Separovic F, idr. A QCM-D and SAXS Study of the Interaction of Functionalised Lyotropic Liquid Crystalline Lipid Nanoparticles with siRNA. *ChemBioChem*. 2017;18(10):921–30.
 76. Zhen G, Hinton TM, Muir BW, Shi S, Tizard M, McLean KM, idr. Glycerol monooleate-based nanocarriers for siRNA delivery in vitro. *Mol Pharm*. 4. september 2012;9(9):2450–7.
 77. Tofani LB, Depieri LV, Campos PM, Riul TB, Antonietto KS, de Abreu Fantini MC, idr. In Vitro TyRP-1 Knockdown Based on siRNA Carried by Liquid Crystalline Nanodispersions: an Alternative Approach for Topical Treatment of Vitiligo. *Pharm Res*. 20. marec 2018;35(5):104.
 78. Vicentini FTM de C, Depieri LV, Polizello ACM, Ciampo JOD, Spadaro ACC, Fantini MCA, idr. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1. januar 2013;83(1):16–24.
 79. Tajik-Ahmadabad B, Chollet L, White J, Separovic F, Polyzos A. Metallo-Cubosomes: Zinc-Functionalized Cubic Nanoparticles for Therapeutic Nucleotide Delivery. *Mol Pharmaceutics*. 4. marec 2019;16(3):978–86.
 80. European Medicines Agency. Buvidal EPAR [Internet]. 2018 [citirano 17. februar 2025]. Dostopno na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/buvidal>
 81. Camurus. FluidCrystal® technology [Internet]. 2023 [citirano 17. februar 2025]. Dostopno na: <https://www.camurus.com/science/technology/>
 82. Farmacevtski terminološki slovar [Internet]. 2020. ((Druga, dopolnjena in pregledana izdaja)). Dostopno na: <https://doi.org/10.3986/978-961-05-0450-4>

