

Primjena nanoterapeutika u liječenju tumora

Valentić, Vesna; Jug, Mario

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2015, 71, 599 - 613**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:298083>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2023-06-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



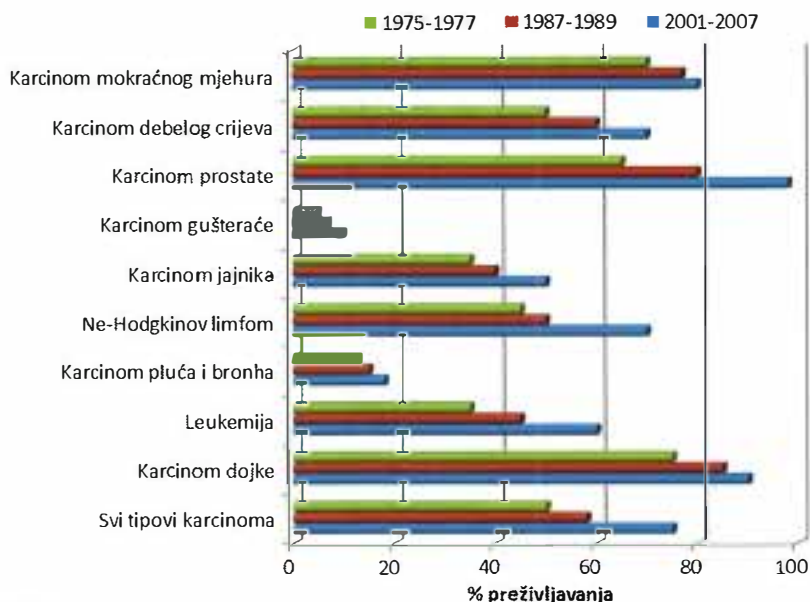
Primjena nanoterapeutika u liječenju tumora

VESNA VALENTIĆ, MARIO JUG

Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, A. Kovačića 1,
10000 Zagreb, Hrvatska

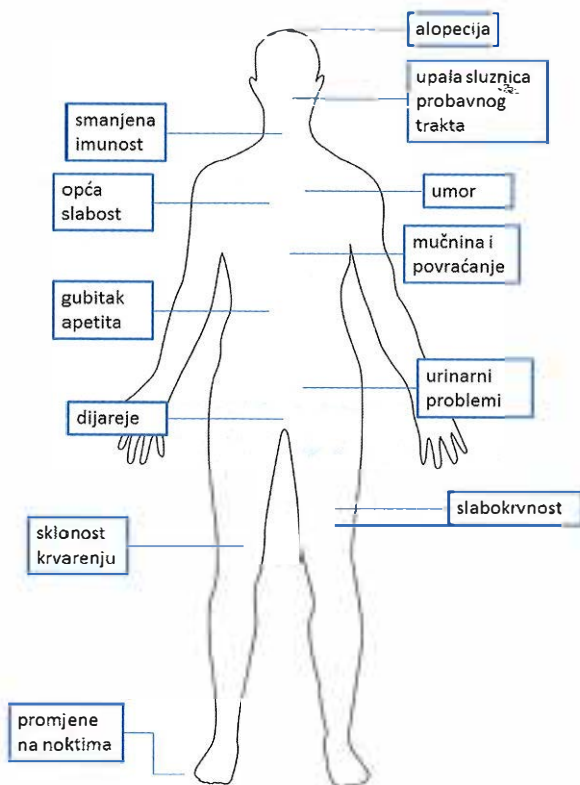
UVOD

Napredak u razumijevanju biologije tumora ostvaren tijekom posljednja dva desetljeća značajno je pridonio uspješnosti u njihovom liječenju (slika 1.). Usprkos tome, prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO), procjenjuje se da je u svijetu 2012. od tumora umrlo približno 8,2 milijuna ljudi, a smatra se da će tijekom slijedeća dva desetljeća taj broj narasti na čak 22 milijuna (1).



Slika 1. Napredak u uspješnosti liječenja različitih tipova karcinoma ostvaren tijekom zadnja tri desetljeća. Iako je kod nekih tipova karcinoma ostvaren zapažen napredak, taj uspjeh se prvenstveno može pripisati napretku u dijagnostici i ranom otkrivanju tumora (1).

Glavni razlog velike smrtnosti bolesnika oboljelih od zloćudnih bolesti pripisuje se nemogućnosti selektivne dostave citostatika u tumorsko tkivo. Zbog nespecifične distribucije u organizmu, njihova primjena karakterizirana je brojnim nuspojavama (slika 2.). Poseban je problem pojava otpornosti tumorskih stanica na djelovanje citostatika te posljedični recidiv bolesti. Novija istraživanja pokazuju da bi primjena nanoterapeutika, odnosno uklapanje citostatika u odgovarajuće nosače nanometarske veličine mogla značajno pridonijeti njihovoj ciljanoj dostavi u tumorsko tkivo te tako povećati učinkovitost terapije uz istodobno smanjenje nuspojava. Zbog toga će se u ovom radu pregledno prikazati prednosti koje bi se mogle ostvariti primjenom nanoterapeutika. Pri tome, težište će se staviti na one pripravke koji su već u kliničkoj primjeni ili u naprednim fazama kliničkih ispitivanja.

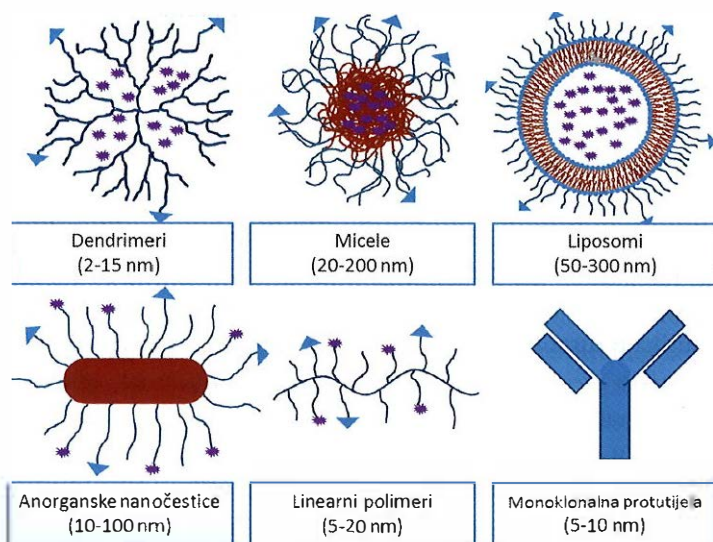


Slika 2. Najčešće nuspojave povezane s primjenom konvencionalnih formulacija citostatika (1).

Nanoterapeutici

Nanoterapeutici sadrže djelatnu tvar uklopljenu u različite nosače nanometarske veličine, u rasponu od 10 do 100 nm. Najčešće obuhvaćaju liposome, micelle, polimerne i čvrste lipidne nanočestice, dendrimere te makromolekularne nosače (slika

3.). Pravilnim oblikovanjem nanoterapeutika moguće je izbjeći njihovu eliminaciju putem bubrega koja je ograničena na čestice manje od 5 nm, a modifikacijom površine vezanjem polietilenglikolskih lanaca (PEG) smanjuje se uklanjanje takvih nanočestica djelovanjem retikuloendotelnog sustava. Na taj se način osigurava produženo zadržavanje nanoterapeutika u sistemskej cirkulaciji, čime se povećava vjerojatnost njihove interakcije s tumorskim tkivom. Za razliku od krvnih žila zdravog tkiva, tumorsku vaskulaturu karakterizira povećana permeabilnost za mikro- i nanočestice, a u isto vrijeme, smanjena je limfna drenaža u tumorskom tkivu. Upravo ta patološka promjena omogućava selektivno nakupljanje i produženo zadržavanje nanoterapeutika u tumorskom tkivu (2, 3). U usporedbi s njima, lijekovi niske molekulske mase neselektivno difundiraju kroz endotel krvnih žila zdravog tkiva, uzrokujući značajne nuspojave (slika 2.).



Slika 3. Shematski prikaz različitih vrsta nanofarmaceutika koji se primjenjuju u liječenju tumora (1).

Uklapanjem citostatika u različite nanoterapeutike moguće je izbjeći probleme vezane uz topljivost i kemijsku stabilnost djelatne tvari. Niska topljivost u vodi značajno ograničava terapijski potencijal citostatika, a može se popraviti uklapanjem u različite nanočestice. Primjerice, topljivost paklitaksela je značajno povećana formulacijom u albuminske nanočestice (Abraxane[®], Abraxis/Celgene). Na taj je način izbjegnuta uporaba Cremophora EL, solubilizatora koji se koristi za osiguranje topljivosti lijeka u konvencionalnim farmaceutskim oblicima, a čija primjena pridonosi učestalosti alergijskih reakcija u bolesnika na kemoterapiji (4). Djelatna tvar uklopljena u nanočestice je zaštićena od razgradnje utjecajem enzima, što rezultira povoljnijim farmakokinetičkim profilom lijeka. Nanoterapeutici se mogu dizajnirati tako

da oslobode uklopljeni sadržaj utjecajem vanjskog podražaja, čime se poboljšava selektivnost terapije. Primjerice, uklapanjem doksorubicina u pH-osjetljive nanočestice može se značajno povećati stanični unos i intracelularno oslobađanje lijeka. Također, primjena nanotehnologije može smanjiti rezistenciju tumorskih stanica na citostatike (1).

Nanoterapeutici za pasivnu dostavu lijeka u tumor

Patološke promjene u građi krvnih žila do kojih dolazi tijekom rasta i razvoja tumora omogućuju pasivnu, ciljanu dostavu citostatika primjenom nanofarmaceutika. Manji solidni tumori nemaju razvijenu vaskulaturu te kisik i nutrijente iz svog okruženja dobivaju difuzijom. Rastom tumora ($>2 \text{ mm}^3$) dolazi do stanične hipoksije što dovodi do prekomjerne ekspresije proangiogenetskih faktora rasta – faktora rasta podrijetlom iz trombocita (PDGF), vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i faktora nekroze tumora-alfa (TNF- α) koji aktiviraju endotelne stanice, što posljedično dovodi do stvaranja lumena krvne žile. Nezrela vaskulatura se remodelira i stabilizira pericitima i stanicama glatkih mišića, no taj je proces često nedovršen te rezultira proširenim i zavojitim krvnim žilama nepravilnog oblika. Na endotelnim stanicama novonastalih krvnih žila su prisutne pore veličine 200 do 800 nm što dovodi do povećane vaskularne permeabilnosti, ekstravazacije i akumulacije nanoterapeutika u intersticijskom prostoru tumora (2). Treba napomenuti da veličina pora na endotelu normalnih krvnih žila iznosi od 5 do 10 nm. Nadalje, u tumorskom tkivu nema limfnih žila ili su nefunkcionalne, što pridonosi selektivnom nakupljanju nanofarmaceutika u tumoru. Ta pojava se naziva EPR efekt (engl. *Enhanced Permeability and Retention effect*) i karakteristična je za većinu tumora, osim za hipovaskularne tumore prostate i gušterače (3). Kako bi se omogućilo pasivno nakupljanje nanofarmaceutika u tumorskom tkivu, potrebno je izbjeći njihovo uklanjanje djelovanjem retikuloendotelnog sustava te im osigurati dovoljno dugu sistemsku cirkulaciju. U tom smislu, veličina, naboj i svojstva površine nanočestica su od ključnog značenja. Iako nanočestice veličine do 400 nm mogu bez ograničenja proći kroz propusni endotel krvnih žila tumora, čestice veće od 100 nm se uklanjaju u jetri, a manje od 10 nm su podložne renalnom klirensu. Zbog toga je optimalna veličina nanofarmaceutika od 10 do 100 nm. Također, preferiraju se neutralne i negativno nabijene čestice, jer su pozitivne podložne brzom klirensu u bubregu. Nadalje, nanočestice je nužno zaštititi od opsonizacije i fagocitoze, čime im se produžava vrijeme sistemske cirkulacije. To se najčešće postiže pegilacijom, tj. vezanjem lanaca polietilenglikola na površini nanofarmaceutika (4).

Na ciljanu pasivnu dostavu nanofarmaceutika u tumor ključnu ulogu ima stupanj vaskularizacije tumora, koja varira kod različitih vrsta tumora. Nadalje, tlak intersticijske tekućine u tumoru je često povišen, što nepovoljno djeluje na transport nanofarmaceutika u tumorsko tkivo (2, 3).

Nanoterapeutici za aktivnu dostavu lijeka u tumor

Aktivna dostava lijeka u tumor postiže se vezanjem specifičnih liganada na površinu nanočestica. Ligandi se vežu za receptore koji su prekomjerno ekspimirani na površini tumorskih stanica, a nisu prisutni na zdravim stanicama. Najčešće proučavani ligandi uključuju monoklonska protutijela, fregmente protutijela ili druge ligande proteinske i neproteinske strukture. Nakon vezanja liganada i receptora dolazi do endocitoze nanoterapeutika u tumorske stanice. Na taj način osigurava se selektivno uništenje tumorskih stanica (2). Za selektivnu dostavu nanofarmaceutika u tumorske stanice koriste se ligandi koji se vežu na sljedeće tipove receptora:

- (i) Transferinski receptor. Riječ je o prijenosnom proteinu za molekulu transferina, koji se nalazi na staničnoj membrani i omogućuje receptorom posredovanu endocitozu transferina i željeza. Kod nekih tipova tumora, ekspresija transferinskog receptora je povećana i do 100 puta u odnosu na zdrave stanice.
- (ii) Folatni receptor. Folatni receptor zastupljen je u dva izooblika: folatni receptor- α je prekomjerno ekspimiran kod 40 % karcinoma, dok je folatni receptor- β prekomjerno ekspimiran na aktiviranim makrofagima i na površini malignih stanica hematopoetskog podrijetla.
- (iii) Glikoproteini ekspimirani na površini stanica. Lektini su proteini koji prepoznaju i vežu ugljikohidratne dijelove glikoproteina koji su ekspimirani na površini stanice. Interakcija lektina i ugljikohidrata je vrlo specifična. Stanice karcinoma često ekspimiraju drukčije glikoproteine od normalnih stanica te se vezanjem lektina na površinu nanočestica može usmjeriti njihovo djelovanje. No, i neki tipovi stanica, kao što su primjerice stanice karcinoma kolona pokazuju prekomjernu ekspresiju specifičnih tipova lektina (galektin 1 i 3), pa je vezanjem odgovarajućih polisaharida na površinu nanofarmaceutika moguće ostvariti njihovu ciljanu aktivnu dostavu u tumorske stanice.
- (iv) Receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR). EGFR pripada skupini tirozin-kinaznih receptora čijom se aktivacijom stimuliraju ključni procesi uključeni u rast i progresiju tumora uključujući proliferaciju, angiogenezu, invaziju i metastaziranje. EGFR je često prekomjerno ekspimiran kod raznih solidnih tumora uključujući kolorektalni karcinom, karcinom skvamoznih stanica glave i vrata, karcinom nemalih stanica pluća, kao i kod karcinoma jajnika, bubrega, gušterače i prostate, a posebno kod karcinoma dojke (HER-2 kod 14–91 % bolesnika).

Osim tumorskih stanica, aktivna ciljana dostava nanoterapeutika usmjerena je i na endotelne stanice krvnih žila tumora (2). Uništavanje endotela krvnih žila kod solidnih tumora dovodi do odumiranja tumorskih stanica, uglavnom u središtu tumora, zbog manjka kisika i nutrijenata, a može regulirati i veličinu tumora te njegovu sposobnost metastaziranja. Ovaj pristup pruža određene prednosti, jer ne zahtijeva ekstravazaciju nanofarmaceutika te je njegovo vezanje na odgovarajuće receptore moguće odmah nakon intravenozne injekcije pripravka. Pri tome je, zahvaljujući

genetskoj stabilnosti endotelne stanice krvnih žila, smanjen rizik od razvoja rezistencije na citostatik, a markeri endotelne stanice su eksprimirani neovisno o tipu tumora, što omogućuje širok spektar primjene takvog lijeka. Za specifičnu aktivnu dostavu nanofarmaceutika u endotelne stanice tumorskih krvnih žila koriste se ligandi koji se vežu na sljedeće tipove receptora:

- (i) Faktor rasta vaskularnog endotela (VEGFR) i njegovi receptori, VEGFR1 i VEGFR2 koji imaju ulogu u angiogenezi i neovaskularizaciji tumora. Hipoksija i onkogeni reguliraju razinu VEGF u tumorskim stanicama koji regulira funkciju VEGF receptora na endotelne stanicama tumora. Moguća su dva pristupa u reguliranju angiogeneze putem VEGF: 1) ciljano djelovanje na VEGFR-2 kako bi se smanjilo vezanje VEGF i inducirala endocitoza i 2) ciljano djelovanje na VEGF kako bi se spriječilo vezanje liganda za VEGFR-2.
- (ii) Integrin $\alpha_v\beta_3$ je receptor na endotelne stanicama za koji se vežu proteini izvanstaničnog matriksa (fibrinogen, fibronektin, vitronektin, trombospodin, osteopontin). Integrin $\alpha_v\beta_3$ je visoko eksprimiran na endotelne stanicama koje su u fazi neovaskularizacije, a slabo je eksprimiran na endotelne stanicama u fazi mirovanja i u većini zdravih organa. Važan je zbog sudjelovanja u signalnim putevima ovisnima o kalciju koji reguliraju migraciju endotelne stanice. Ciklički i linearni derivati RGD (ArgGly-Asp) pokazuju specifično vezanje na $\alpha_v\beta_3$ integrinski receptor.
- (iii) Adhezijska molekula vaskularne stanice-1 (VCAM1) je transmembranski glikoprotein nalik imunoglobulinu koji je eksprimiran na površini endotelne tumorske stanice. VCAM-1 inducira adheziju stanice, ključni korak u angiogenezi. VCAM-1 je prekomjerno eksprimiran kod raznih vrsta tumora uključujući leukemiju, karcinom dojke i pluća, melanom, karcinom bubrežne stanice, karcinom želuca i nefroblastom.
- (iv) Metaloproteinaze matriksa (MMP) pripadaju skupini endopeptidaza ovisnih o cinku. MMP razgrađuju ekstracelularni matriks i imaju važnu ulogu u angiogenezi i metastaziranju, odnosno, u migraciji i invaziji endotelne stanice, stvaranju kapilara te pokreću antigen-prezentirajuće stanice. Membranski tip 1 MMP je eksprimiran na endotelne tumorske stanicama uključujući karcinom pluća, želuca, debelog crijeva i grlića maternice, glioma i melanoma. Aminopeptidaza N/CD13, metaloproteinaza koja uklanja aminokiseline s N-terminalnog segmenta peptida ili proteina, je receptor na površini endotelne stanice uključen u invaziju tumora, razgradnju ekstracelularnog matriksa i metastaziranje tumora. NGR (Asn-Gly-Arg) peptid se veže za aminopeptidazu.

Nanofarmaceutici osjetljivi na podražaj

Nova strategija u postizanju selektivne dostave lijeka u tumor je usmjerena prema razvoju nanoterapeutika osjetljivih na podražaj. Riječ je o nanočesticama koje su neaktivne u sisternskoj cirkulaciji, a aktiviraju se po dolasku u tumorsko tkivo

djelovanjem različitih endogenih ili egzogenih čimbenika. Aktivirani oblik nanofarmaceutika omogućuje oslobađanje uklopljenog lijeka ili njegovu interakciju s ciljnim tkivom, smanjujući sistemsku izloženost citostatiku. Endogeni podražaji posljedica su specifičnosti tumorske građe i uključuju promjene u pH vrijednosti, prekomjernu ekspresiju određenih enzima i prisustvo reducensa u hipoksičnoj okolini tumora. Primjerice, kod solidnih tumora je pH-vrijednost ekstracelularne tekućine niža (pH 6,0 – 7,0) u odnosu na sistemsku. Također, pH-vrijednost unutar intracelularnih organela se razlikuje u odnosu na onu u citoplazmi ili krvi, pa se može iskoristiti kako bi se osiguralo intracelularno oslobađanje lijeka iz nanofarmaceutika (1, 2). Vanjski podražaji uključuju fizikalne podražaje kao što su temperatura, svjetlost, ultrazvuk, magnetske i električne sile.

Intenzivno se radi i na razvoju multifunkcionalnih nanočestica koje bi omogućile istodobnu dijagnozu i liječenje karcinoma. Nadalje, takav suvremeni nanofarmaceutik bi mogao omogućiti objedinjavanje više različitih terapijskih pristupa te istodobno ciljano djelovanje na stanice karcinoma i endotelne stanice tumorskih krvnih žila (1).

Nanofarmaceutici u kliničkoj primjeni

Konjugati lijeka

Konjugati lijeka su trenutno najuspješniji nanoterapeutici u kliničkoj primjeni (tablica 1.). Ubrajaju se u nanofarmaceutike zbog veličine od 5 do 20 nm (slika 3.). Djelatna tvar je kovalentno vezana za protutijela, peptide ili polimere, čime se osigurava ciljana dostava lijeka u tumor, bez nužnog utjecaja na njegovu topljivost, stabilnost ili biorazgradivost (1, 5).

Tablica 1. Odobreni nanofarmaceutici bazirani na konjugatima lijeka i protutijela.

| Naziv (Proizvođač) | Protutijelo | Meta | Lijek | Indikacija | Odobreno |
|--|--------------------------|------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Mylotrag® (Pfizer/Wyeth) | Gemtuzumab ozogamicin | CD33 | kalikeamicin | Akutna mijeloična leukemija | 2001. (povučen 2010.) |
| Adcetris® (Seattle Genetics) | Brentuksimab vedotin | CD30 | Monometil auristatin E | Ne-Hodgkinov limfom | 2011. |
| Kadcyla® (Roche/ Genentech/ ImmunoGen) | Trastuzumab emtansin | HER2 | emtansin | Karcinom dojke | 2013. |
| Zevalin® (IDEC/Spectrum) | Ibritumomab tiuksetan | CD20 | Itrij-90 ili Indij-111 | Ne-Hodgkinov limfom | 2002. |
| Bexxar® (Corixa/ GlaxoSmith/Kline) | Tositumomab | CD20 | Jod-131 | Ne-Hodgkinov limfom | 2003. (povučen 2014.) |

Konjugati lijeka i antitijela koji su odobreni za kliničku primjenu uključuju trastuzumab-emtansin za liječenje HER2 pozitivnog karcinoma dojke te brentuksimab-vedotin za liječenje CD30 pozitivnog Hodgkinovog limfoma i anaplastičnog limfoma velikih stanica. Trastuzumab se pokazao učinkovitim u kliničkoj upotrebi kao pomoćno i palijativno sredstvo. Konjugacija s emtansinom (DM1), inhibitorom mikrotubula biljnog podrijetla, značajno povećava antitumorsku aktivnost trastuzumaba.

Vedotin ili monometil auristatin E je citostatik koji se zbog toksičnosti ne primjenjuje u slobodnom obliku. Vezanjem za anti-CD30 antitijelo (vendotin brentuksimab) djelovanje lijeka se selektivno usmjerava na stanice karcinoma koje ekspimiraju CD30 protein što mu znatno smanjuje toksičnost, a u isto vrijeme zadržava učinkovitost u liječenju bolesnika s Hodgkinovim limfomom, ostvarujući smanjenje tumora u 94, a potpunu remisiju u 33 % bolesnika u ITT skupini (engl. *intention-to-treat*) (1).

Kod polimernih konjugata, lijek je putem odgovarajuće skupine vezan na polimer te čini terapijski sustav veličine od 5 do 10 nm, koji može značajno promijeniti farmakokinetički profil konjugiranog lijeka (2). Trenutno je više od 15 antitumorskih polimernih konjugata lijeka u kliničkim ispitivanjima. Svi se nakupljaju u tumorima putem EPR efekta. Polimerni konjugat N-(2-hidroksipropil)metakrilamidnog kopolimera (HPMA) i doksorubicina, PK1, uzrokuje značajno manju kardiotoksičnost i pojavu alopecije u odnosu na slobodni doksorubicin, a tijekom druge faze kliničkih ispitivanja je pokazao obećavajuću terapijsku aktivnost u liječenju karcinoma dojke i karcinoma nemalih stanica pluća. Modifikacijom kopolimerne okosnice HPMA konjugata galaktozaminskim ostacima, ostvarena je aktivna ciljana dostava doksorubicina u jetru (1).

Radiopeptidi čine specifičnu skupinu konjugata lijeka, koji se veličinom od 1 nm nalaze na donjoj granici obuhvaćenom konvencionalnom definicijom nanoterapeutika. Najčešće korišteni terapijski radiopeptidi su DOTATOC[®] i DOTATATE[®]. Radiopeptidi se sastoje od peptidne komponente koja određuje specifičnost dostave spoja i kelatora koji veže radioizotop (npr. ⁹⁰Y ili ¹⁷⁷Lu). DOTATOC i DOTATATE se vežu uglavnom na receptor za somatostatin 2 te dopremaju radioizotop selektivno do stanica koje prekomjerno ekspimiraju taj tip receptora. Uglavnom je riječ o neuroendokrinim stanicama. Podaci treće faze kliničkih ispitivanja učinkovitosti tih radiopeptida biti će dostupni tijekom 2017. godine (1).

Lipidne nanočestice

Od različitih tipova lipidnih nanočestica koje se ispituju kao terapijski sustavi u terapiji tumora, istaknuto mjesto zauzimaju liposomi (slika 2., tablica 2.). Riječ je o sferičnim fosfolipidnim vezikulama u kojima je unutarnja vodena faza obavijena jednim ili više koncentričnih obavijenih fosfolipidnih dvosloja. U odnosu na konjugate

Tablica 2. Ostali nanofarmaceutici odobreni za terapiju karcinoma.

| Proizvod (Kompanija) | Nosač | Lijek | Indikacija | Odobreno |
|--|-------------------------------------|---|---|--|
| Abraxane* (Abraxis/Celgene) | Lijek vezan za albumin | Paklitaksel | Karcinom dojke, karcinom gušterače, karcinom nemalih stanica pluća | 2005. |
| DaunoXome* (Galen) | Liposom | Daunorubicin | Kaposijev sarkom | 1996. |
| DepoCyt* (Pacira) | Liposom | Citozin arabinozid (Citarabin) | Neoplastični meningitis | 1999. 1995. |
| Doxil/Caelyx* (Johnson & Johnson) | Liposom | Doksorubicin | Kaposijev sarkom Karcinom jajnika Karcinom dojke Multipli mijelom | 1999. 2003. 2007. (Europa, Kanada) |
| Genexol-PM* (Samyang Biopharm) | PEG-PLA kopolimerne micele | Paklitaksel | Karcinom dojke Karcinom pluća Karcinom jajnika | 2007. (Južna Koreja) |
| Lipo-Dox* (Taiwan Liposome) | Liposom | Doksorubicin | Kaposijev sarkom Karcinom dojke Karcinom jajnika | 1998. (Tajvan) |
| Marqibo* (Talon) | Liposom | Vinkristin | Akutna limfocitna leukemija | 2012. (SAD) |
| Mepact* (Takeda) | Liposom | Mifamurtid MTP-PE | Osteosarkom | 2009. (EU) |
| Myocet* (Cephalon) | Liposom | Doksorubicin | Karcinom dojke | 2000. (Europa) |
| NanoTherm* (Magforce Nanotechnologies) | Nanočestice željezovog oksida | | Glioblastom | 2010. (Europa) |
| Oncaspar* (Enzon/Sigma-tau) | Konjugat PEG-a i proteina | L-asparaginaza | Leukemija | 2006. |
| Zinostatin stimalamer* (Yamanouchi) | Konjugat polimera i proteina | Konjugat neocarzinostatina i kopolimera stirena i maleinskog anhidrida (SMANCS) | Karcinom jetre Karcinom bubrega | 1994. (Japan) |

lijeka, koji mogu vezati od 1 do 6 molekula lijeka, liposomi imaju kapacitet uklapanja lijeka veći za 3 do 4 reda veličine (1, 5). Do sada registrirani liposomalni pripravci ostvaruju selektivno nakupljanje u tumorskom tkivu zahvaljujući EPR efektu. Pegilirani liposomalni doksorubicin (Doxil[®] ili Caelyx[®]) je prvi registrirani nanofarmaceutik. Odobren je 1995. za liječenje Kaposijevog sarkoma povezanog s HIV-om, a 1998. godine za rekurentni karcinom jajnika. Uklapanjem doksorubicina u pegilirane liposome značajno je produženo vrijeme sistemske cirkulacije lijeka, pri čemu poluvrijeme eliminacije takvog nanofarmaceutika iznosi 45 h, u odnosu na 10 h za slobodni lijek. Također, liposomalna formulacija osigurava 4–16 puta veću dopremu lijeka u tumorsko tkivo uz istodobno smanjenje kardiotoksičnosti doksorubicina. Zanimljivo, kod liposomalne formulacije doksorubicina, značajno je povećana učestalost pojave palmarno-plantarne eritrodizestezijske, kožne reakcije na lijek koja zahvaća šake i stopala (6). Trenutno je osim Doksila za kliničku primjenu odobreno još pet nanoterapeutika: nepegilirani liposomski doksorubicin (Myocet[®]), nepegilirani liposomski daunorubicin (DaunoXome[®]), nepegilirani liposomski citarabin (DepoCyt[®]), liposomski vinkristin sulfat (Marqibo[®]) i liposomski mifamurtid (Mepact[®]). Niti jedna od šest odobrenih liposomskih formulacija nema svojstvo aktivne ciljane dostave, no uklapanjem doksorubicina, daunorubicina i vinkristina u liposome značajno je produženo vrijeme sistemske cirkulacije lijeka uz postizanje prihvatljivijeg toksikološkog profila lijeka i posljedično smanjenje nuspojava (1, 6–7).

Da bi postigli aktivnu ciljanu dostavu, nužno je modificirati površinu liposoma vezanjem protutijela ili njihovih fragmenata. Međutim, time se značajno smanjuje vrijeme sistemske cirkulacije nastalih imunoliposoma. Smatra se da prisutnost Fc fragmenta protutijela pridonosi uklanjanju imunoliposoma iz sistemske cirkulacije djelovanjem retikuloendotelnog sustava. Stoga se preferira korištenje protutijela bez Fc fragmenta. Na primjer, protutijelima kao što su anti-EGFR koje djeluje protiv receptora faktora epidermalnog rasta (npr. C225, cetuksimab) ili anti-VEGFR2 (pr. DC101) protutijelo na ljudski čimbenik rasta vaskularnog endotela, moguće je proteolitičkom digestijom ukloniti Fc fragmente. Preostali Fab' fragmenti se mogu potom kovalentno vezati za maleimidne grupe na kraju (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamin-N-[amino(polietilen glikol) lanaca koji je uklopljen u lipidnom dvo-sloju liposoma. Rezultati predkliničkih ispitivanja terapijske učinkovitosti imunoliposoma s doksorubicinom bili su obećavajući, no u kliničkim ispitivanjima je uočena izražena mijelosupresija, zbog koje se terapija morala prekinuti (1).

Polimerne nanočestice

Polimerne nanočestice mogu biti načinjene od prirodnih ili sintetskih polimera. Abraxane[®] (nab-paklitaksel) je za sada jedini registrirani nanoterapeutik baziran na prirodnim polimerima (tablica 2.). Riječ je o nanočesticama paklitakselna veličine oko 130 nm, u kojima je lijek vezan na humani serumski albumin, a koristi se u liječenju karcinoma dojke, pluća, gušterače i karcinoma nemalih stanica pluća. Nakon iv.

primjene, nanočestice brzo disociraju u topljive komplekse paklitaksela i albumina, prosječne veličine 10 nm (6). Kao što je već spomenuto, na taj je način povećana topljivost lijeka te je izbjegnuta uporaba Cremophora EL, čija se primjena u konvencionalnim farmaceutskim oblicima paklitaksela povezuje s povećanom učestalosti alergijskih reakcija u bolesnika na kemoterapiji. Nadalje, nab-paklitaksel je moguće rekonstituirati u fiziološkoj otopini u koncentraciji od 2 do 10 mg/mL, dok je kod formulacije s Cremoforom EL maksimalna koncentracija koja se može prirediti u rasponu od 0,3 do 1,2 mg/mL. Usljed toga, volumen infuzije te vrijeme primjene je značajno smanjeno (30 min za nab-paklitaksel vs. 3 h za konvencionalnu formulaciju), a nije potrebna predmedikacija primjenom kortikosteroida i antihistaminika. Također, izbjegava se opasnost vezana uz ekstrakciju plastifikatora iz infuzijskih vreća i cijevi do koje dolazi zbog prisustva Chremofora EL u konvencionalnoj formulaciji (4).

Međutim, kod nab-paklitaksela je uočena povećana učestalost neuroloških nuspojava u odnosu na konvencionalnu formulaciju lijeka, što se povezuje s promjenama u farmakokinetici lijeka oblikovanog u nanočestice. Iako nab-paklitaksel nije nanoterapeutik s aktivnom ciljanom dostavom, prisustvo albumina pridonosi transcitozi nanočestica putem gp60-albuminskih receptora prisutnih na endotelu krvnih žila. Vežanjem albumina za površinski gp60 receptor dolazi do vežanja kaveolina-1 te stvaranja kaveola, transcitotičnih vezikula. Na taj način albumin potpomaže endotelnu transcitozu sastojaka plazme i povećava njihovu dopremu u tumor. Smatra se da nab-paklitaksel djeluje ciljano na tumorsko tkivo zbog visoke metaboličke potražnje i aktivnog transporta proteina plazme potrebnih za anaboličke procese u stanicama tumora. Nab-paklitaksel može biti transportiran u tumor vežanjem na osteonektin, matricelularni protein koji je ključan za progresiju različitih tipova karcinoma. Osteonektin i kaveolin-1 su često prekomjerno eksprimirani kod nekih tipova karcinoma dojke, pluća i prostate što objašnjava nakupljanje lijekova vezanih za albumin kod tih tipova karcinoma (2, 8).

U kliničkim ispitivanjima nab-paklitaksel je pokazao povećanu učinkovitost kod bolesnika s karcinomom dojke u usporedbi s konvencionalnom formulacijom paklitaksela (Taxol®). Pri tome je 33 % bolesnika tretiranih nab-paklitakselom imalo pozitivan odgovor na terapiju uz prosječno vrijeme preživljavanja od 65 tjedana, dok je u skupini bolesnika liječenoj konvencionalnom formulacijom taj postotak iznosio 19 %, a vrijeme preživljavanja 55,7 tjedana (9). Kod bolesnika s karcinomom gušterače, liječenje nab-paklitakselom u kombinaciji s gemcitabinom je produljio preživljavanje bolesnika u odnosu na skupinu koja je primala monoterapiju gemcitabinom. Primjenom nab-paklitaksela u kombinaciji s karboplatinom u bolesnika s uznapredovalim karcinomom pluća nemalih stanica usporena je progresija bolesti, no ukupno vrijeme preživljavanja nije bilo značajno dulje u odnosu na skupinu bolesnika koja je primala konvencionalnu formulaciju paklitaksela u kombinaciji s karboplatinom.

Učinkovitost nab-paklitaksela potaknula je razvoj novih nanofarmaceutika baziranih na albuminu s docetakselom i rapamicinom, koji su trenutno u kliničkim ispitivanjima (1).

Kopolimerne micelle

Kopolimerne micelle (slika 3., tablica 2.) su skupina nanofarmaceutika građene od blok kopolimera, koji pokazuju svojstvo spontane samoorganizacije u vodenom mediju. Pri tome, hidrofobni dijelovi kopolimera čine jezgru micelle u koju je uklopljen lijek, dok su hidrofilni dijelovi kopolimera orijentirani prema površini micelle, osiguravajući topljivost i sterički stabilizirajući nastalu strukturu. Kopolimerne micelle načinjene od ambifilnih kopolimera polietilenglikola (PEG) i poliaminokiselina razvijene su kao terapijska platforma za primjenu različitih citostatika (5, 10). U kliničkim ispitivanjima je dokazano da se uklapanjem cisplatina u kopolimerne micelle bazirane na PEG-poliglutaminskoj kiselini (Nanoplatin[®]) može značajno smanjiti učestalost nuspojava lijeka, kao što su oto- i neurotoksičnosti te mučnina. Smatra se da su te nuspojave uzrokovane visokim plazmatskim koncentracijama slobodnog cisplatina, karakterističnim za i.v. primjenu konvencionalnih formulacija ovoga lijeka. Uklapanjem lijeka u kopolimerne micelle, dolazi do stvaranja koordinativno-kovalentne veze između cisplatina i poliaminokiselinskih ograna blok kopolimera koji čine jezgru micelle. Na taj se način postiže produženo oslobađanje cisplatina iz micela, te se izbjegavaju visoke plazmatske koncentracije slobodnog lijeka, koje uzrokuju navedene nuspojave. Najčešće nuspojave zabilježene tijekom I. faze kliničkih ispitivanja Nanoplatina[®] su uključivale slabost (52,9 %), mučninu i gubitak teka (47,1 %), povraćanje (41,2 %), te slabljenje bubrežne funkcije (35,3 %). Tijekom primjene Nanoplatina[®] u dozama od 90 do 120 mg m⁻² pojava oto- i neurotoksičnosti, koje su karakteristične za cisplatin, nije uočena (11). U tijeku je III. faza kliničkih ispitivanja učinkovitosti Nanoplatina[®] u liječenju karcinoma gušterače (1, 10). Također, obećavajuće je rezultate pokazala i micelarna nanoformulacija paklitaksela. Uklapanjem paklitaksela u micelle načinjene od kopolimera građenog od PEG i modificiranog poliaspartata uspješno je pripravljena parenteralna formulacija ovog teško topljivog lijeka bez uporabe organskih otapala. Rezultati predkliničkih ispitivanja pokazuju da primjenom takve micelarne formulacije paklitaksela dolazi do nakupljanja lijeka u tumoru, rezultirajući 25 puta većim koncentracijama lijeka u tumorskom tkivu u odnosu na one ostvarene primjenom slobodnog lijeka, a istodobno je značajno smanjena njegova neurotoksičnost (12). Klinička ispitivanja učinkovitosti micelarne formulacije paklitaksela u liječenju karcinoma želuca i karcinoma dojke su u tijeku (10).

Zanimljivi rezultati su ostvareni i uklapanjem citostatika u kopolimerne micelle građene od blok kopolimera baziranih na kitozanu i njegovim derivatima. Kitozan, deacilirani produkt hitina je biokompatibilan i biorazgradljiv polimer koji u strukturi sadrži mnogobrojne -OH i -NH₂ skupine, koje omogućuju njegovu kemijsku modifikaciju (13). Uklapanjem doksorubicina u kopolimerne micelle bazirane na

blok kopolimerima karboksimetilkitozana i stearinske kiseline ostvareno je produženo zadržavanje lijeka u cirkulaciji uz pH-ovisno oslobađanje, a zamijećeno je povećano nakupljanje doksorubicina u jetri i slezeni. Također, intenzivno se istražuje primjena kopolimernih micela baziranih na kitozanskim blok kopolimerima kao nosača za male interferirajuće ribonukleinske kiseline. Smatra se da bi se primjenom takvih nanofarmaceutika moglo postići utišavanje različitih onkogenih ili eksprimiranje tumor supresorskih gena (5).

Anorganske nanočestice

Anorganske nanočestice se uglavnom koriste u dijagnostičke svrhe te da bi se poboljšala učinkovitost radioterapije. Trenutno se u kliničkim ispitivanjima istražuje sigurnost primjene nanočestica željezovog oksida kao kontrastnog sredstva pri snimanju tumora magnetskom rezonancijom (1).

Novi pristup u liječenju solidnih tumora osigurava NanoTherm[®], vodena koloidna disperzija magnetskih nanočestica željezovog oksida koje se iniciraju izravno u tumor (tablica 2.). Riječ je o biokompatibilnim nanočesticama željezovog oksida s aminosilanskom ovojnicom promjera približno 12 nm koje se aktiviraju promjenjivim magnetskim poljem te stvaraju toplinu. Ovisno o trajanju terapije i temperaturi postignutoj u tumoru, stanice tumora se nepovratno oštećuju ili postaju osjetljivije za dodatnu kemoterapiju ili radioterapiju. Ovim je pristupom moguće boriti se protiv tumora štedeći zdravo tkivo. Zahvaljujući aminosilanskoj ovojnici nanočestice ostaju na mjestu primjene te su omogućeni ponovljeni tretmani. U kliničkim istraživanjima je potvrđena sigurnost i učinkovitost primjene NanoTherm magnetnih nanočestica u kombinaciji s perkutanom radioterapijom u liječenju rekurentnog glioblastoma. U odnosu na kontrolnu skupinu, zabilježeno je do 13 mjeseci dulje preživljavanje bolesnika koji su bili liječeni NanoTherm[®]-om. Klinička primjena NanoTherm[®]-a odobrena je u Europskoj uniji 2010. godine (14, 15).

ZAKLJUČAK

U zadnjih je par desetljeća razvoj nanofarmaceutika bio usmjeren prema optimizaciji fizikalno-kemijskih svojstava nanočestica, kao što su veličina, oblik, svojstva površine, naboj i karakteristike oslobađanja lijeka kako bi se poboljšao farmakokinetički profil lijeka te osigurala njegova selektivna dostava. Razvijen je niz različitih tipova nanofarmaceutika s citostaticima od kojih su mnogi u kliničkoj primjeni. Riječ je o pripravcima koji osiguravaju pasivnu ciljanu dostavu citostatika u tumor zahvaljujući prolasku nanočestica kroz propusnu tumorsku vaskulaturu, čime je značajno smanjena sistemska toksičnost tih lijekova. Rezultati novijih istraživanja naglašavaju važnost razumijevanja utjecaja građe i fiziologije tumora na farmakokinetiku, biodostupnost i intratumorsku penetraciju nanočestica. Optimizacija postojećih

nanofarmaceutika uvažavajući specifičnosti tumorskog okruženja rezultirat će razvojem novih terapijskih sustava nanometarske veličine, koji će značajno pridonijeti dijagnozi, liječenju te prevenciji karcinoma.

Nanopharmaceuticals in cancer therapies

by V. Valentić, M. Jug

Abstract

Nanopharmaceuticals (1–100 nm) represent an opportunity of improving the cancer treatment. Due to its unique characteristics, nanopharmaceuticals have many advantages over conventional chemotherapy. The most important advantage is the potential of targeted delivery of drugs to the tumor tissue resulting in lower systemic toxicity which is the most prominent disadvantage of conventional chemotherapy. Nanoparticles can passively reach the tumor tissue through the leaky vasculature surrounding the tumor due to the increased permeability and retention effect. In active targeting, targeting ligands are attached at the surface of the nanocarrier for binding to appropriate receptors overexpressed by the tumor cells or tumor vasculature and not expressed by the normal cells. Stimuli-sensitive nanocarriers respond to physical, chemical, or biological stimuli that promote the release of the drug. Multifunctional nanocarriers have several useful properties. Theranostics are an emerging subset of multifunctional nanocarriers which provide both the diagnosis and treatment with the same nanoformulation. Various types of nanopharmaceuticals have been used in clinical cancer treatment, including drug conjugates, lipid or polymer-based nanocarriers and inorganic nanoparticles. At the present, the most successful nanomedicine therapeutics in clinical cancer care are drug conjugates. Most clinically available nanocarrier-based cancer therapeutics are passively targeted first-generation nanomedicine drugs. In order to reach the target site, nanoparticles have to avoid degradation by the mononuclear phagocyte system and renal filtration, extravasate into tumor compartment, travel through the tumor stroma against high interstitial fluid pressure gradients, and then interact with target cells or release the drug payload for pharmacological effect. Therefore, for optimal delivery it is necessary to optimize not only the physicochemical properties of the nanoparticles, but also to consider the tumor microenvironment.

1. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in Cancer Therapy: Challenges, Opportunities, and Clinical Applications, *J. Control. Release* 2015; 200:138–157.
2. Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *J. Control. Release* 2010; 148:135–146.
3. Nichols JW, Bae YH. Odyssey of a cancer nanoparticle: From injection site to site of action, *Nano Today* 2012; 7:606–618.
4. Stinchcombe TE. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel: A novel Cremphor-EL-free formulation of paclitaxel. *Nanomedicine-UK* 2007; 2: 415–23.
5. Ernsting MJ, Murakami M, Roya A, Li SD. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J. Control. Release* 2013; 172: 782–794.
6. Zhu Y, Liao L. Applications of Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery: A Review. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2015; 15: 4753–4773.
7. Barenholz YC. Doxil[®] –The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Control. Release* 2012; 160: 117–134.
8. Desai N, Trieu V, Damascelli B, Soon-Shiong P. SPARC Expression Correlates with Tumor Response to Albumin-Bound Paclitaxel in Head and Neck Cancer Patients, *Trans. Oncol.* 2009; 2:59–64.
9. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, Hawkins M, O'Shaughnessy J. Superior efficacy of albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with metastatic breast cancer: results of a Phase III trial. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 1–10.
10. <http://www.nanocarrier.co.jp/cn/research/pipeline/index.html>, datum pristupa 1.7.2015.
11. Plummer R, Wilson RH, Calvert H, Boddy AV, Griffin M, Sludden J, Tilby MJ, Eatock M, Pearson DG, Ottley CJ, Matsumura Y, Kataoka K, Nishiya T. A phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours. *Brit. J. Cancer* 2011; 104:593–598.
12. Hamaguchi T, Matsumura Y, Suzuki M, Shimizu K, Goda R, Nakamura I, Nakatomi I, Yokoyama M, Kataoka K, Kakizoe T. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumor activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel, *Brit. J. Cancer* 2005; 92:1240–1246.
13. Kandra P, Jyoti Kalangi HP. Current understanding of synergistic interplay of chitosan nanoparticles and anticancer drugs: merits and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 99: 2055–2064
14. Singh A, Sahoo SK. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics, *Drug Discov. Today* 2014; 19: 474–481.
15. Gil PR, H ihn D, del Mercato LL, Sasse D, Parak WJ. Nanopharmacy: Inorganic nano-scale devices as vectors and active compounds. *Pharmacol. Res.* 2010; 62:115–125.

Primljeno 10. srpnja 2015.