

# Primjena ciklodekstrina u razvoju terapijskih sustava za dostavu antitumorskih lijekova

---

**Nikolin, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:214868>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-16**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Martina Nikolin**

**Primjena ciklodekstrina u razvoju terapijskih  
sustava za dostavu antitumorskih lijekova**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marija Juga.

*Veliko hvala mom mentoru na strpljenju, trudu i stručnom vodstvu.*

*Neizrecivo hvala mojim roditeljima i bratu na podršci, ljubavi i pomoći.*

*I na kraju, hvala mojim prijateljima, svaki dan je lakši i ljepši uz vas.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Tumori .....	1
1.2 Antitumorski lijekovi.....	2
1.3 Farmakološka podjela citostatika .....	3
1.4 Sigurnost primjene i nuspojave antitumorskih lijekova .....	5
1.5. Izazovi u formulaciji antitumorskih lijekova .....	6
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	7
3. MATERIJALI I METODE .....	8
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	9
4.1 CIKLODEKSTRINI.....	9
4.1.1 Struktura i karakteristike ciklodekstrina.....	9
4.1.2 Derivati ciklodekstrina .....	10
4.1.3 Toksikološki profil ciklodekstrina.....	10
4.1.4. Nanostrukture bazirane na ciklodekstrinima .....	13
4.1.5 Interakcija ciklodekstrina s endogenim molekulama .....	14
4.2 PRIMJENA CIKLODEKSTRINA U FORMULACIJAMA CITOSTATIKA.....	15
4.2.1 Evomela.....	15
4.2.2 CRLX101 .....	16
4.2.3 Deflexifol®.....	18
4.2.4 Sorafenib.....	19
4.2.5 NanoFEN.....	20
4.2.6 Albendazol.....	21
4.3 SMJEROVI DALJNJEG RAZVOJA.....	22
4.3.1 Ciljana terapija pomoću hijaluronske kiseline .....	22
4.3.2 Ciljana terapija pomoću folne kiseline .....	23

4.3.3 Ciljana terapija pomoću estrogenskih receptora.....	23
4.3.4 RGD tripeptid .....	24
4.3.5 Magnetne nanočestice .....	25
4.3.6 Dostava gena .....	26
5. ZAKLJUČCI .....	28
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....	29
7. LITERATURA.....	30
8. SAŽETAK.....	35
8. SUMMARY .....	36

# 1. UVOD

## 1.1. Tumori

Tumori su mase ili nakupine stanica koje karakterizira ubrzan rast u odnosu na brzinu rasta zdravih stanica. Oni su nesvrhovite i neorganizirane mase koje nisu ovisne o fiziološkim sustavima organizma, ali istovremeno iskorištavaju i iscrpljuju organizam unutar kojega rastu ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)). Onkološke bolesti su na drugom mjestu po smrtnosti u svijetu, odmah iza kardiovaskularnih bolesti. Broj novooboljelih od tumora u svijetu 2020. godine bio je 19.3 milijuna, a umrlih 10 milijuna ([www.who.int](http://www.who.int)). Šekerija i suradnici (2021) objavili su podatke za Republiku Hrvatsku, a isti su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019. godine.

	Ukupno	Žena	Muškaraca
<b>Broj novodijagnosticiranih zloćudnih bolesti u Republici Hrvatskoj 2019. godine</b>	25 352	11 805	13 547
<b>Broj umrlih od zloćudnih bolesti u Republici Hrvatskoj 2019. godine</b>	13 344	5 616	7 728

Tumorske stanice nastaju iz zdravih stanica procesom koji se naziva neoplastična preobrazba. Neoplastična preobrazba je složena, stupnjevita, ali i nepotpuno razjašnjena promjena stanica ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)). Uzroci nastanka tumora mogu biti nasljedne genetske predispozicije, izloženost karcinogenim tvarima ili infekcija virusima poput humanog papiloma virusa, hepatitisa B, hepatitisa C, Epstein – Barr virusa ili virusa humane imunodeficijencije, ali često je točan uzrok nepoznat. Rizični čimbenici za razvoj tumora su dob, spol, prehrana, okoliš, lijekovi, izloženost ionizirajućem zračenju i brojni drugi. Od navedenih, najvažniji su okolišni faktori poput zračenja, karcinogenih tvari i izloženosti virusima. Prevencija tumora je moguća u 30 do 50% pacijenata, uz mjere poput prestanka pušenja, cijepljenja protiv virusnih bolesti, održavanja zdrave težine i redovitih pregleda kod liječnika ([www.who.int](http://www.who.int)). Međutim, brojnost uzroka i čimbenika rizika ograničava prevenciju nastanka tumora tako da se tumori liječe kirurškim uklanjanjem, kemoterapijom i radioterapijom.

Histogenetska podjela tumora dijeli tumore prema ishodišnom tkivu iz kojeg nastaje tumor na karcinome, sarkome, leukemije, limfome, gliome, melanome i druge. Karcinomi su tumori nastali iz epitela, sarkomi tumori nastali iz mezenhima (koštanog, vezivnog, mišićnog

ili masnog tkiva), leukemije nastaju iz matičnih krvnih stanica, limfomi iz stanica limfatičkih organa, a gliomi i melanomi iz stanica živčanog sustava ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)).

Ovisno o kliničkim svojstvima, tumori se dijele na benigne i maligne. Benigni ili dobroćudni tumori se ne šire u zdravo tkivo jer su od njega odvojeni vezivnim tkivom i ne metastaziraju. Često ne zahtijevaju liječenje ili se uklanjaju kirurški. Maligni ili zloćudni tumori se šire u okolno zdravo tkivo, ali i u udaljena tkiva, odnosno metastaziraju. Metastaze su patološke tvorbe koje su se putem krvi ili limfe proširile s jednog mjesta na drugo. Sposobnost metastaziranja tumora proizlazi iz činjenice da dio subpopulacije tumorskih stanica unutar tumorske mase, nazvan tumorske matične stanice, zadržava mogućnost ponavljanja ciklusa proliferacije i mogućnost migracije u druge dijelove tijela (Katzung, 2020).

## **1.2 Antitumorski lijekovi**

Antitumorski lijekovi ili citostatici su skupina lijekova koji se koriste u liječenju tumora. Djeluju različitim mehanizmima na tumorske stanice, ali i na zdrave stanice organizma. Danas se oko jedne trećine bolesnika liječi metodama tzv. lokalnog liječenja, u slučaju da je u vrijeme postavljanja dijagnoze tumor ostao lokaliziran. Rana dijagnoza tumora i metode lokalnog liječenja povećavaju šanse za izlječenje. Međutim, često je potrebna sustavna kemoterapija zbog nastanka mikrometastaza. Udio preživjelih nakon sustavne kemoterapije je oko 10%. Znatno bolji rezultati postižu se ako se sustavna kemoterapija kombinira s radioterapijom, kada je postotak preživjelih oko 50% (Katzung, 2020).

Primarna ili indukcijska kemoterapija je proces liječenja pacijenata s uznapredovalom metastatskom zloćudnom bolesti za koje ne postoji drugi učinkoviti terapijski pristup. Ciljevi takvog liječenja su ublažavanje simptoma bolesti, poboljšanje kvalitete života i produljenje očekivano vrijeme života, a tek kod malog dijela bolesnika dolazi do izlječenja. Izlječivim tumorima u odraslih osoba smatraju se Hodgkinov i non-Hodkinov limfom, akutna mijeloična leukemija, karcinom zametnih stanica i korikarcinom, a u djece akutna limfoblastična leukemija, Burkittov limfom, Wilmsov tumor i embrionalni rambdomiosarkom (Katzung, 2020).

Neoadjuvantna kemoterapija je primjena kemoterapije u bolesnika s lokaliziranim karcinomom koji imaju druge terapijske mogućnosti, ali se te mogućnosti nisu pokazale u potpunosti učinkovitima. Koristi se kod karcinoma anusa, mokraćnog mjehura, dojke, jednjaka i želuca, grkljana te osteogenog sarkoma. Cilj neoadjuvantne kemoterapije prije kirurškog zahvata je smanjiti veličinu tumora kako bi kirurško uklanjanje tumora bilo jednostavnije i učinkovitije, a kod kemoterapije karcinoma rektuma ili grkljana prije kirurškog odstranjivanja

prednost je i očuvanje zdravih dijelova tih organa (Katzung, 2020). Neoadjuvantna terapija omogućuje procjenu odgovora tumora na kemoterapiju i raniji prestanak ili promjenu terapije ako je pacijent rezistentan što smanjuje izlaganje nepotrebnim toksičnim učincima (Masood, 2016).

Adjuvantna kemoterapija je dodatak lokalnim načinima liječenja, odnosno kirurškom zahvatu ili radioterapiji. Nakon kirurškog uklanjanja tumorske mase provodi se kemoterapija kako bi se smanjila incidencija lokalne i sustavne pojave bolesti te kako bi se povećalo preživljenje bolesnika (Katzung, 2020). Meta analiza je pokazala da se kod pacijentica s karcinomom jajnika u prvom stadiju znatno povećalo ukupno preživljenje (eng. *overall survival*) i preživljenje bez ponovnog oboljenja (eng. *disease-free survival*) tijekom 10 godina (Lawrie i sur., 2015).

Kemoterapija može biti monoterapija ili kombinacijska terapija, pri čemu je kod kombinirane primjene citostatika uočena manja pojavnost rezistencije tumora. Velik problem u farmaceutskoj industriji je cijena razvoja novih lijekova pa se postojeći citostatici kombiniraju kako bi se postigao sinergistički učinak i bolji odgovor, te smanjenje doze zbog sinergističkog učinka lijekova čini kombiniranu terapiju sigurnijom za pacijente od monoterapije (Bayat i sur., 2017).

### **1.3 Farmakološka podjela citostatika**

Citostatici se prema mehanizmu djelovanja dijele na alkilirajuće lijekove, antimetabolite, kemoterapijske lijekove prirodnog podrijetla, antitumorske antibiotike i ostale lijekove za liječenje tumora (Katzung, 2020).

Alkilirajući lijekovi djeluju citotoksično prijenosom alkilne skupine na različite dijelove stanice, a pretpostavlja se da je najvažnija interakcija s DNA, odnosno da alkiliranjem DNA dolazi do stanične smrti. Glavno mjesto alkiliranja je N7 pozicija u gvaninu, ali alkiliraju se i pozicije N1 i N3 u adeninu, N3 u citozinu i O6 u gvaninu. Alkिलiranjem gvanina dolazi do pogrešnog kodiranja ili do lomova DNA. Stanice su posebno osjetljive u G<sub>1</sub> i S fazi staničnog ciklusa. Na alkilirajuće su lijekove posebno osjetljive stanice koje se dijele pa su tumorske stanice osjetljivije od zdravih stanica (Katzung, 2020).

Antimetaboliti čine skupinu racionalno razvijenih lijekova, koji su osmišljeni na temelju spoznaja o staničnim procesima u sintezi DNA. Možemo ih podijeliti na antifolate, fluoropirimidine, analoge deoksicitidina i antagoniste purina. Antifolati su lijekovi koji inhibiraju enzime uključene u sintezu tetrahidrofolne kiseline. Fluoropirimidini se aktiviraju u 5-fluorouridin-5'-trifosfat koji se ugrađuje u RNA ili u 5-fluorodeoksiuridin-5'-trifosfat koji se



ugrađuje u DNA što rezultira inhibicijom sinteze i funkcije DNA, odnosno citotoksičnim učinkom. Analози deoksicitidina se ugrađuju u DNA i RNA pa dolazi do poremećaja elongacije lanaca. Metaboliti antagonista purina inhibiraju nekoliko enzima *de novo* sinteze purinskih nukleotida, dok se monofosfatni (aktivni) oblik ugradi u strukturu DNA ili RNA. Neki od ovih lijekova, primjerice kapecitabin, dizajnirani su tako da se selektivno aktiviraju enzimima koji su prisutni samo u tumorskim stanicama pa se na taj način postiže selektivno djelovanje. Iako je i kod kapecitabina zabilježen niz nuspojava, incidencija štetnih učinaka je znatno niža nego kod neselektivnih antimetabolita (Katzung, 2020).

Kemoterapijski lijekovi prirodnog podrijetla uključuju vinka alkaloidе, taksane, edipodofilotoksine i kamptotekine. Vinka alkaloidi potječu iz biljne vrste *Vinca rosea* (madagaskarskog zimzelena) i djeluju inhibicijom polimerizacije tubulina, odnosno prekidom nastanka diobenog vretena i prekidom mitoze u metafazi. Taksani se dobivaju iz vrsta *Taxus brevifolia* (paciifičke tise) i *Taxus baccata* (europske tise), a djeluju vezanjem na mikrotubule što također inhibira mitozu i staničnu diobu. Edipodofilotoksini su polusintetski derivati podofilotoksina dobivenog iz vrste *Podophyllum peltatum* (žutike) i djeluju inhibicijom topoizomeraze II što inhibira sintezu DNA. Kamptotecini su analози prirodnih spojeva koji se izoliraju iz kineske biljne vrste *Camptotheca acuminata* te inhibiraju topoizomazazu I, enzim odgovoran za cijepanje i ponovne spajanje jednostrukih lanaca DNA (Katzung, 2020).

Antitumorski antibiotici su kemijske tvari koje inhibiraju stanični rast mikroba, a pokazale su se učinkovitima i u kemoterapiji karcinoma. Antraciklinski antibiotici su često korišteni citostatici koji djeluju putem četiri glavna mehanizma: inhibicijom topoizomeraze II, stvaranjem slobodnih radikala, visokospecifičnim vezanjem na DNA te remećenjem transporta tekućine i iona. Dobivaju se iz *Streptomyces peucetiuc* var *caesius*. Mitomicin C se izolira iz *Streptomyces caepitosus* te se reducira u alkilirajuću tvar koja se veže za DNA. Tumorske stanice mogu biti hipoksične, kada su osjetljivije na mitomicin C. Bleomicin je peptid koji veže DNA i dvovalentno željezo čime inhibira sintezu DNA te stvara slobodne radikale (Katzung, 2020).

Ostali antitumorski lijekovi su oni koji se ne uklapaju u tradicionalne podjele, a uključuju različita monoklonska protutijela i novije antitumorske lijekove (Katzung, 2020).

#### 1.4 Sigurnost primjene i nuspojave antitumorskih lijekova

Alkilirajući lijekovi djeluju štetno na ona tkiva koja se brzo dijele, kao što su stanice koštane srži, probavnog sustava i reproduktivnog sustava. Ovi lijekovi su po prirodi karcinogeni, odnosno povećavaju rizik od sekundarnih malignoma, primjerice od akutne mijeloične leukemije. Akutna toksičnost ovih lijekova odnosi se uglavnom na mučninu i povraćanje, dok se odgođeno javljaju mijelosupresija, neuropatija, poremećaji funkcije jetre i bubrega i sl (Katzung, 2020).

Antimetaboliti najčešće uzrokuju mukozitis, mijelosupresiju te mučninu i povraćanje. Analizi purina pokazuju imunosupresijski učinak; inhibiraju aktivnost CD<sub>4</sub> i CD<sub>8</sub> T limfocita pa su pacijenti skloniji oportunističkim infekcijama poput gljivica, herpesa i *Pneumocystis jiroveci* pneumonije (Katzung, 2020).

Česte toksičnosti prirodnih antitumorskih lijekova su kardiotoksičnost, neurotoksičnost, alopecija, mijelosupresija i mukozitis. Rjeđe se javljaju nuspojave poput sindroma neadekvatne sekrecije antidiuretskog hormona (SIADH) kod vinka alkaloida, a za neke novije formulacije, primjerice liposomalni irinotekan, još nema dovoljno podataka o štetnim učincima (Katzung, 2020).

Antraciklini zbog produkcije slobodnih radikala dovode do kardiotoksičnosti. Akutna kardiotoksičnost označava prolazne aritmije i promjene u EKG-u koje u većini slučajeva prolaze bez simptoma. Kronična kardiotoksičnost antraciklina ovisi o dozi, ali može dovesti do zatajenja srca. Danas se antraciklini primjenjuju posebnim protokolom primjene manjih doza tjedno ili u kontinuiranoj infuziji tijekom 72 sata kako bi se smanjila toksičnost. Osim toga, odobren je i kelator željeza deksrazoksan za smanjenje kardiotoksičnosti kod žena s metastatskim karcinomom dojke koje su dobile dozu doksorubicina od 300 mg/m<sup>2</sup>. Ipak, toksičnost koja ograničava dozu antraciklina nije kardiotoksičnost, nego mijelosupresija. S druge strane, mitomicin se može koristiti intravezikalno protiv površnog karcinoma mokraćnog mjehura kada se ne apsorbira i ima minimalnu sistemsku toksičnost. Bleomicin uzrokuje pnemonitis s kašljem, zaduhom i suhim hropcima u inspiriju. Kod starijih pacijenata može se pojaviti plućna toksičnost koja u rijetkim slučajevima može biti i smrtonosna (Katzung, 2020).

Monoklonska protutijela koja se koriste u borbi protiv karcinoma često izazivaju akneiformni kožni osip i hipomagnezijemiju. Kod humanih protutijela poput panitumumaba moguće su infuzijske reakcije preosjetljivosti. Male molekule kao što su erlotinib i afatinib najčešće uzrokuju akneiformni kožni osip, proljev i anoreksiju, ali izvrtinib, lijek iz iste skupine, uzrokuje specifičnu srčanu toksičnost. Lijekovi koji djeluju na vaskularni endotelni čimbenik

rasta uzrokuju hipertenziju, komplikacije krvarenja i umor, a moguće je i kongestivno zatajenje srca (Katzung, 2020).

### **1.5. Izazovi u formulaciji antitumorskih lijekova**

Većina antitumorskih lijekova je slabo topljiva u vodi što ograničava njihovu kliničku upotrebu. Netopljivost u vodi nije problem samo već postojećih lijekova, već i novih kemoterapeutika. Procjenjuje se da je više od 75% lijekova u fazi razvoja slabo topljivo u vodi (Di i sur., 2012). Metode kojima se postiže veća topljivost u vodi su priprava prolijekova, korištenje surfaktanata i suotapala, inkapsuliranje u nanosustave za dostavu lijekova ili kompleksacija s ciklodekstrinima. U formulacijama koje su dostupne na tržištu uglavnom se koriste visoke koncentracije surfaktanata ili suotapala, no upravo su neki surfaktanti i suotapala uzrok neželjenih reakcija na lijek, npr. Cremophor EL, etanol i Tween 80. Cremophor EL je surfaktant odgovoran za hipersenzitivnost kod 30-40% pacijenata koji intravenski primaju Taxol (paklitaksel). Osim toga, Cremophor EL reagira s ambalažom stvarajući toksične spojeve (Narvekar i sur., 2014).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Tumori su vrlo heterogena skupina bolesti čija incidencija raste, a uzrok često nije moguće precizno odrediti. Iz tog razloga lijekovi djeluju na već nastali tumor s različitom učinkovitošću, ovisno o stadiju tumora u trenutku započinjanja terapije. Citostatici su uglavnom vrlo lipofilne molekule, odnosno teško su topljivi u vodi. Trenutno se za njihovu solubilizaciju koriste suotapala ili surfaktanti koji često dovode do neželjenih reakcija. Kako bi se osigurala sigurnost pacijenata, istražuju se alternativni pristupi poput CD. CD su pomoćne tvari koje se koriste za povećanje topljivosti lijekova. Njihova prednost nad ostalim solubilizatorima je netoksičnost. Upotrebom CD se smanjuje potrebna količina suotapala koji su potencijalni iritansi i tenzida koji uzrokuju otpuštanje histamina. U posljednjih nekoliko godina istražuju se modifikacije CD koje bi mogle omogućiti ciljanu dostavu antitumorskih lijekova. Iako je antitumorska terapija napredovala, ciljano djelovanje lijeka na tumorske stanice još nije postignuto. Kada bi lijek djelovao ciljano, doze lijeka bi bile manje što bi smanjilo nuspojave i oštećenje zdravih stanica. Osim toga, smanjenje doze bi utjecalo i na smanjenje troškova zdravstvenog sustava, smanjenje zagađenja okoliša lijekovima, smanjenje dužine hospitalizacije pacijenata i smanjenje smrtnih ishoda.

Cilj ovog rada je dati sustavan pregled saznanja o potencijalu primjene CD u razvoju suvremenih formulacija antitumorskih lijekova s unaprijeđenom učinkovitošću i sigurnosti primjene.

### **3. MATERIJALI I METODE**

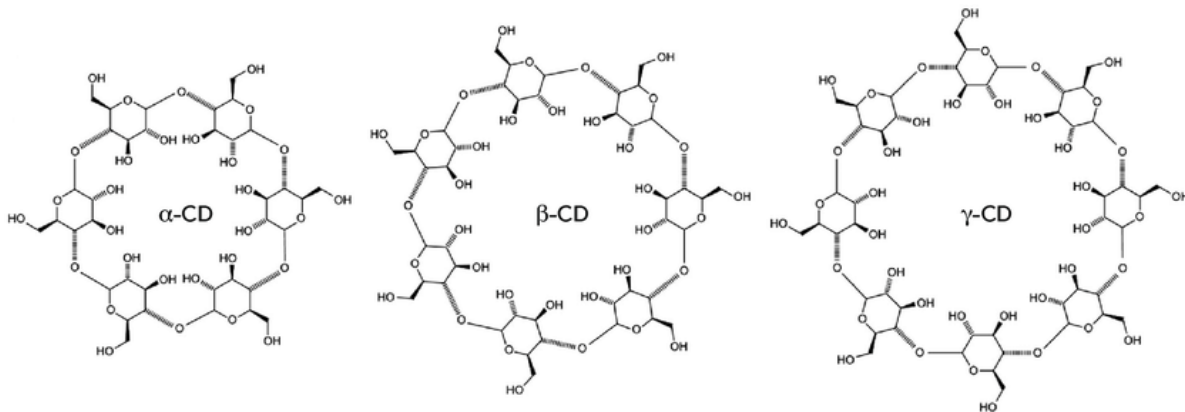
U izradi ovog preglednog diplomskog rada korišteni su različiti preglednici znanstvene literature kao što su baze podataka (PubMed, PubFacts, Science Direct), društvena mreža Research Gate, znanstvene i stručne knjige te mrežne stranice sa srodnom tematikom, uključujući mrežne stranice Europske agencije za lijekove i Američke Agencije za hranu i lijekove. Više od 95% ovog diplomskog rada temeljeno je na radovima objavljenima u znanstvenim časopisima. Metode rada uključivale su uglavnom pretraživanje uz pomoć ključnih riječi vezanih za određeno potpoglavlje ovog diplomskog rada. Iz relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji podaci, rezultati i zaključci, te su pregledno prikazani u ovom diplomskom radu.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Ciklodekstrini

#### 4.1.1 Struktura i karakteristike ciklodekstrina

Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi izgrađeni iz  $\alpha$ -1,4-D-glukopiranoznih jedinica. Najčešći su  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD i  $\gamma$ -CD, tzv. prirodni CD (*eng. parent CDs*), izgrađeni od 6, 7 i 8 D-glukopiranoznih jedinica. Oni se mogu pronaći u brojnim proizvodima, npr. u pivu, kozmetičkim preparatima i lijekovima. U Europskoj farmakopeji nalaze se monografije  $\alpha$ -CD i  $\beta$ -CD, a od 2004. godine nalaze se na GRAS (*eng. generally regarded as safe*) listi američke Agencije za hranu i lijekove kao aditivi u prehrambenoj industriji. U Europi je kao aditiv odobren samo  $\beta$ -CD uz ADI (*eng. acceptable daily intake*) od 5 mg/kg/dan ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).



Slika 1. Struktura  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD i  $\gamma$ -CD (preuzeto iz Nikitenko i sur., (2013) uz dopuštenje izdavača)

Struktura CD je krnji šuplji stožac čija je površina hidrofilna, a unutrašnjost lipofilna. Molekule koje su teško topljive u vodi uklapaju se u lipofilnu šupljinu CD čime nastaje inkluzijski kompleks (Gandhi i sur., 2020). Time se postiže veća topljivost lijekova u vodenom mediju pa se CD većinom koriste kao solubilizatori. Inkluzijski se kompleksi konstantno formiraju i raspadaju, odnosno molekule lijeka koje su u kompleksu s CD su u dinamičkoj ravnoteži s molekulama lijeka koje su slobodne u otopini (Saokham i sur., 2018).

CD imaju i druge uloge: mogu maskirati neugodan okus i miris lijeka, smanjiti ili spriječiti iritaciju gastrointestinalnog trakta, stabilizirati prezasićene otopine, spriječiti interakcije lijeka s drugim pomoćnim tvarima u istoj formulaciji ili pretvoriti ulja i tekućine u mikrokristalične i amorfne praške ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Nedavno su sintetizirani manji CD građeni iz 3 i 4 D-glukopiranozne jedinice, a postoje i veći CD, ali rijetko se koriste jer ih je teško proizvesti i ograničena im je sposobnost stvaranja inkluzijskih kompleksa (Jansook i sur., 2018).

#### 4.1.2 Derivati ciklodekstrina

Ako uspoređujemo prirodno dostupne CD, šupljina  $\beta$ -CD je veličinom najpovoljnija za uklapanje većine lijekova. Međutim,  $\beta$ -CD je ujedno i najmanje topljiv derivat u vodi jer se njegove susjedne C2-OH i C3-OH skupine povezuju vodikovom vezom, a time se cijeloj molekuli smanje fleksibilnost i sposobnost stvaranja vodikovih veza s vodom. Kako bi se spriječilo nastajanje intramolekularne vodikove veze, molekule CD se modificiraju maskiranjem primarnih i sekundarnih hidroksilnih skupina (Saokham i sur., 2018).

Za farmaceutsku industriju značajni su nasumično metilirani, hidroksipropilirani i sulfobutilesterski derivati  $\beta$ -CD, a ostali derivati CD koriste se za specifične namjene poput uklanjanja polutanata iz okoliša. Derivati mogu imati različit stupanj supstitucije (DS, eng. *degree of substitution*), što utječe na fizikalno-kemijska svojstva derivata. Stupanj supstitucije je definiran kao prosječni broj supstituenata po jednoj molekuli CD. Istraživanja su pokazala da je najveća topljivost u vodi za nasumično metilirani  $\beta$ -CD (RM $\beta$ CD) kada je stupanj supstitucije oko 14, odnosno kada su dvije trećine hidroksiliranih skupina metilirane. Ako je stupanj supstitucije veći od 14, topljivost CD se smanjuje. Metilirani i hidroksipropilirani derivati  $\beta$ -CD smanjuju površinsku napetost vode, proporcionalno stupnju supstitucije. Prirodni  $\beta$ -CD nema utjecaj na površinsku napetost vode, kao ni sulfobutylski derivati (Saokham i sur., 2018).

#### 4.1.3 Toksikološki profil ciklodekstrina

Zbog svoje veličine i hidrofilnosti, CD se iz probavnog trakta apsorbiraju u zanemarivom opsegu. U odraslih ljudi oralna bioraspoloživost CD je između 0.1% i 3% primijenjene doze. Primjena velikih količina CD (više od 1 g/kg/dan) u oralnim pripravcima mogu uzrokovati reverzibilni proljev i povećanje slijepog crijeva u životinja. Međutim, taj učinak u ljudi je slabije izražen. Svi prirodni CD sigurni su za primjenu u hrani te se ne očekuju interakcije s vitaminima i drugim nutrijentima ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Istraživanja na mladim štakorima pokazuju da hidroksipropil- $\beta$ -CD (HP $\beta$ CD) ima znatno veću oralnu bioraspoloživost kod tek rođenih štakora. Povećana apsorpcija smatra se posljedicom nerazvijenog gastrointestinalnog trakta, nerazvijenih bubrega, razlike u prehrani i razlike u crijevnoj mikrofliori. Međutim, malobrojni podaci o primjeni itrakonazola s 200 mg

HP- $\beta$ -CD/kg/dan u djece mlađe od dvije godine tijekom dva tjedna pokazuju oralnu bioraspoloživost manju od 1% ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Nazalnom primjenom visokih doza CD može doći do njihove povećane bioraspoloživosti iako se, u pravilu, CD loše apsorbiraju preko sluznica tijela. Međutim, CD solubiliziraju lipide iz membrane i tako joj naruše integritet što povećava bioraspoloživost lijekova, ali i samih CD. Pokazalo se da su učinci perturbacije membrane blagi i reverzibilni, osim kod  $\beta$ -CD koji je pri koncentraciji od 20% uzrokovao jaka oštećenja sluznice tijekom 5 minuta. *In vivo* istraživanja primjene RM $\beta$ CD u dozama manjim od 20% nisu pokazala toksične učinke na sluznicu. U dozi do 10% nije primijećeno oštećenje sluznice pa se smatra da otopine RM $\beta$ CD i HP $\beta$ CD ne uzrokuju oštećenje tkiva kada su primijenjeni u koncentraciji manjoj od 10%. Štoviše, ispitivanja na zdravim dobrovoljcima pokazuju da HP $\beta$ CD u toj dozi ima izvrsnu podnošljivost ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Također, CD slično djeluju na mukozne membrane pluća pa imaju veliku bioraspoloživost i nakon intratrahealne primjene ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

CD u rektalnim pripravcima djeluju kao pospješivači apsorpcije lijekova, što se objašnjava promjenama permeabilnosti sluznice i interakcijom između CD i glicerida koji su dio baze supozitorija. Ipak, treba uzeti u obzir moguću iritaciju rektalne sluznice i apsorpciju samih CD rektalnom primjenom. Rektalnom primjenom 230 mg  $\beta$ -CD u formulaciji ljekovitih klizmi i 12% HP $\beta$ CD u uljastim supozitorijima nije uočena iritacija sluznice rektuma, a RM $\beta$ CD uzrokuje blagu iritaciju rektalne sluznice nakon primjene supozitorija s inzulinom u zečeva što povećava bioraspoloživost inzulinu. Smatra se da bi  $\alpha$ -CD mogao uzrokovati deskvamaciju i degeneraciju epitelnih stanica.  $\alpha$ -CD se kombinira s ksantanskom gumom čime se postiže postepeno otpuštanje CD iz supozitorija, odnosno dolazi do manje iritacije ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Transdermalna apsorpcija CD je slaba kada se primjenjuju sami, npr. samo 0.02% HP $\beta$ CD se apsorbira nakon primjene na kožu šišmiša. Međutim, u okluzivnim uvjetima te u prisustvu tvari koje poboljšavaju apsorpciju, mogu prodrijeti u kožu. U kozmetičkim pripravcima se CD koriste kao solubilizatori lipofilnih mirisnih komponenti, posebice HP $\beta$ CD, i tako zamjenjuju surfaktante koji se pjene, uzrokuju iritacije ili zamućenost pripravka. Ipak, CD mogu ulaziti u interakcije s dijelovima kože. Izvlačenjem lipida iz kože CD narušavaju barijernu funkciju kože, a moguće su i iritacije u visokim koncentracijama. Postoje dokazi o citotoksičnosti  $\beta$ -CD i RM $\beta$ CD, ali je za HP $\beta$ CD dokazano da je siguran za upotrebu. Koncentracije manje od 0.1%  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD i  $\gamma$ -CD smatraju se sigurnima za korištenje ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).



U oftalmičkim pripravcima CD povećavaju topljivost, apsorpciju i stabilnost lijekova te smanjuju lokalnu iritaciju oka. Inkluzijski kompleks se prenosi preko vodenog sloja suznog filma pa je dostupnost lijeka na lipofilnoj površini oka je povećana.  $\alpha$ -CD se koristi kao solubilizator ciklosporina u oftalmičkim pripravcima, ali pri koncentraciji od 4% javljaju se toksični učinci poput gubitka mikrovila i mikroerozija rožnice. RM $\beta$ CD iritira rožnicu zeca već pri koncentraciji od 5%, ali se unatoč tome koristi u formulaciji oftalmičkih proizvoda. SBE $\beta$ CD u koncentraciji od 10 % i HP $\beta$ CD u koncentraciji od 12.5% imaju dobru podnošljivost ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Nakon parenteralne primjene CD se brzo eliminiraju bubrezima, pri čemu je ukupan klirens približno jednak brzini glomerularne filtracije. Poluvrijeme eliminacije je između 20 i 100 minuta za većinu derivata, osim za RM $\beta$ CD koji ima dulje poluvrijeme eliminacije.  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD i RM $\beta$ CD su nefrotoksični nakon intravenske primjene te stoga nisu primjereni za parenteralne pripravke.  $\gamma$ -CD uzrokuje reverzibilne promjene na bubrezima i na europskom tržištu nema parenteralnih pripravaka s  $\gamma$ -CD. HP $\beta$ CD i SPE $\beta$ CD imaju dobru podnošljivost i široko se koriste u parenteralnim pripravcima za odrasle i djecu stariju od 2 godine. Istraživanja na štakorima pokazuju vakuolaciju tubularnih stanica bubrega nakon primjene visokih doza HP $\beta$ CD i SPE $\beta$ CD, ali bez gubitka renalne funkcije. Također, dugotrajna primjena nižih doza ima isti učinak što ukazuje na važnost duljine izloženosti. Iz tog se razloga CD ne primjenjuju kod osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom. Djeca mlađa od 2 godine su, u teoriji, manje izložena nefrotoksičnosti CD, ali zbog premalo podataka upotreba CD nije indicirana. Malobrojni podaci o korištenju HP $\beta$ CD i SPE $\beta$ CD u novorođenčadi pokazuju dobru podnošljivost ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Ukupan rizik korištenja CD u ljekovitim pripravcima nije velik za odrasle, zdrave osobe. Smatra se da su doze CD manje od 20 mg/kg/dan sigurne za sve puteve primjene, a iznad te doze pokazuju malu aktivnost. Doze veće od 200 mg/kg/dan mogu izazvati probavne smetnje nakon oralne primjene, a nakon sistemske izloženosti moguća je blaga renalna toksičnost. Apsorpcija iz topikalnih pripravaka je relativno mala pa su sistemski toksični učinci malo vjerojatni. Ipak, zbog međudjelovanja s drugim tvarima u pripravku preporuka je ispitati sigurnost gotovog proizvoda i upozorenja jasno označiti u Sažetku opisa svojstava lijeka ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

#### 4.1.4. Nanostrukture bazirane na ciklodekstrinima

U koncentriranim otopinama prirodni CD stvaraju agregate pomoću mreže vodikovih veza, tzv. policiklodekstrine.  $\alpha$ -CD pomiješan s polietilenglikolom daje polipseudorotaksan, strukture u kojima uklapanjem PEG polimernih lanaca u centralne šupljine CD nastaje kompleksna, umrežena trodimenzionalna struktura. Ako se dva kraja polimernog lanca spoje u struktru sličnu ogrlici, nastaje polirotaksan. Polirotaksani se koriste u sustavima za dostavu lijekova, primjerice za dostavu gena ili polinukleoteida u stanice. CD se mogu povezivati i kovalentnim vezama ako se uvedu nove funkcionalne skupine, pri čemu se modificiraju hidroksilne skupine na položajima 2, 3 i 6. Osnovne metode za sintezu modificiranih CD su deprotonacija, dehidracija i kondenzacija (Haimhoffer i sur., 2019).

Primjenom CD su razvijeni pametni sustavi za dostavu lijekova koji su osjetljivi na promjene pH, temperature ili na svjetlost određene valne duljine. CD konjugirani polimerom (npr. N-izopropilakrilamidom, akrilamidom, akrilnom kiselinom ili PEG-om) mijenjaju topljivost kao odgovor na promjenu temperature, odnosno prelaze iz gel u sol stanje. Za tumorske bolesti najkorisniji su sustavi koji odgovaraju na promjenu pH jer je mikrookoliš tumora kiselijji od krvi i drugih tkiva. Promjenom pH dolazi do otpuštanja djelatne tvari iz šupljine CD. Nosače osjetljive na NIR (eng. *near – infrared light*, 980 nm) čine fotoreaktivni kopolimeri umetnuti u  $\beta$ -CD, a pod utjecajem infracrvene svjetlosti dođe do otpuštanja lijeka iz kompleksa (Haimhoffer i sur., 2019).

Nanospužve su tip polimera koji ima visoko-umreženu trodimenzionalnu strukturu. Nisu topljive u vodi, a veličina im je 200-300 nm. Dijelimo ih u četiri generacije ovisno o njihovim svojstvima. Najjedostavnije su nanospužve prve generacije koje se sintetiziraju unakrsnim povezivanjem CD pomoću diizocijanata, difenilkarbonata, epiklorohidrina, limunske kiseline ili drugih odgovarajućih molekula. Druga generacija nanospužvi ima specifična svojstva poput naboja ili fluorescencije. Treća generacija je osjetljiva na vanjske stimulanse poput temperature i pH. MIP metodom (eng. *molecular imprinting*) nastaju nanospužve četvrte generacije, odnosno polimeri sa šupljinama koje su krojene specifično za određenu molekulu lijeka (Haimhoffer i sur., 2019).

Amfifilni CD su derivati u kojima se supstitucijom hidroksilnih grupa hidrofobnim lancima otvara mogućnost slaganja CD u micelle i nanočestice ili umetanja u lipidne membrane (Haimhoffer i sur., 2019).

#### 4.1.5 Interakcija ciklodekstrina s endogenim molekulama

CD stvaraju komplekse s lipofilnim molekulama, kako s lijekovima tako i s endogenim molekulama.  $\alpha$ -CD tvori komplekse s fosfolipidima, a  $\beta$ -CD s membranskim kolesterolom. Ovisno o dozi,  $\alpha$ -CD i  $\beta$ -CD mogu uzrokovati hemolizu i citotoksičnost, ali se supstitucijom hidroksilnih skupina navedeni štetni učinci mogu smanjiti. Interakcija s  $\beta$ -CD smanjuje sadržaj kolesterola u membrani što ometa funkciju stanične membrane (Haimhoffer i sur., 2019).

P-glikoprotein je transporter iz skupine ABC transportera koji ima zaštitnu ulogu, odnosno interferira s oralnom apsorpcijom lijekova i toksina te s njihovim prelaskom krvno-moždane barijere. U kompleksnom međudjelovanju P-glikoproteina i membranskog mikrokoliša sudjeluje i kolesterol. Nedostatak kolesterola u membrani inhibira funkciju P-glikoproteina pa upotreba  $\beta$ -CD i njegovih derivata može povećati oralnu bioraspoloživost lijekova koji su supstrati P-glikoproteina, npr. DM $\beta$ CD povećava oralnu bioraspoloživost takrolimusa u štakora (Haimhoffer i sur., 2019).

Utjecaj CD na razine kolesterola može se iskoristiti u terapiji Niemann Pick bolesti tipa C, koju karakterizira poremećeno skladištenje kolesterola. U tom slučaju je *in vitro* pokazano da se HP $\beta$ CD unosi u stanicu endocitozom i tako smanjuje razine kolesterola koji su zarobljeni u lizosomima ili kasnim endosomima (Haimhoffer i sur., 2019).

## 4.2 Primjena ciklodekstrina u formulacijama citostatika

Biotehnoški napreci tijekom posljednja tri desetljeća doveli su do značajnog povećanja broja proizvedenih CD, odnosno do smanjenja troškova njihove proizvodnje. Iz tog razloga su nam danas lako dostupni  $\beta$ CD i njihovi derivati visoke čistoće (Gandhi i sur., 2020).

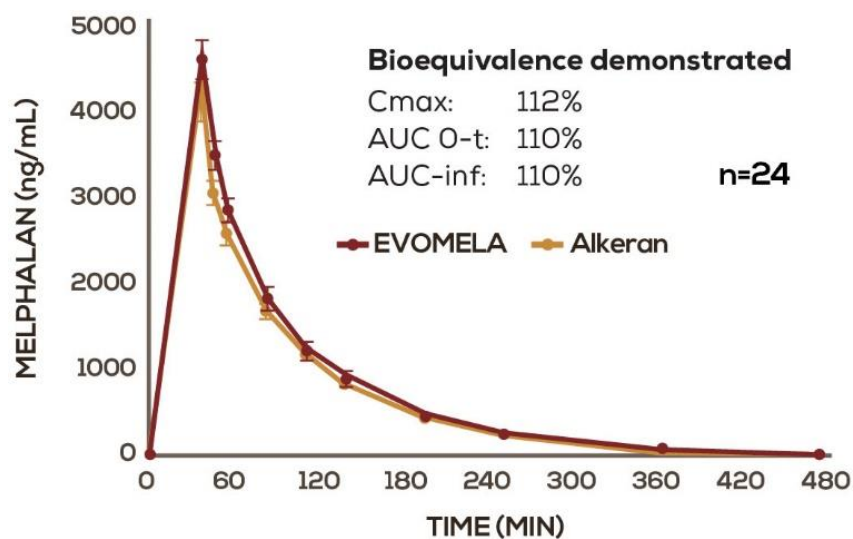
Postoje dva načina primjene CD u formulacijama lijekova. Prvi uključuje stvaranje inkluzijskih kompleksa s lijekom s ciljem povećanja njegove topljivosti i/ili kemijske stabilnosti, a drugi je primjena CD u izradi nanostrukture koji djeluju kao nosači citostatika. Nanostrukture koje su izgrađene iz CD priređuju se tzv. dualnim pristupom koji kombinira stvaranje inkluzijskih kompleksa i formiranje nanosustava za dostavu lijekova u jedan sustav, pri čemu su povećane prednosti oba pristupa. Pri tome, povećava se kapacitet CD za lijekove, učinkovitost uklapanja lijeka, produljuje prisutnost lijeka u sistemskej cirkulaciji, smanjuje toksičnost lijeka i omogućava kontrolirano, odgođeno ili ciljano oslobađanje lijeka iz kompleksa (Gidwani i Vyas, 2015).

### 4.2.1 Evomela

Melfalan je alkilirajući agens koji se koristi kao standardna terapija u liječenju multiplog mijeloma kod pacijenata kod kojih je moguća transplantacija. Konvencionalni farmaceutski oblici melfalana sadrže propilen glikol kao su-otapalo jer je topljivost melfalana u vodenom mediju vrlo niska. Parenteralnom primjenom propilen glikol može uzrokovati nuspojave poput renalne disfunkcije, srčanih aritmija i metaboličke acidoze. Također, nakon rekonstitucije takvih formulacija potrebno je primijeniti lijek u točno određenom vremenskom periodu jer je kemijska stabilnost otopine izrazito ograničena (Aljitiawi i sur., 2014).

Kako bi se riješili navedeni problemi, u Evomela<sup>®</sup> formulaciji koristi se SBE $\beta$ CD kao solubilizator za melfalan. Provedeno je križno kliničko ispitivanje faze IIa pri čemu je utvrđeno da je formulacija s CD bioekvivalentna onoj s propilenglikolom jer su nakon intravenske primjene koncentracije lijeka u plazmi bile gotovo jednake, pri čemu je  $c_{\max}$  Evomele<sup>®</sup> bila 4374 ng/mL, a  $c_{\max}$  formulacije s propilenglikolom 3931 ng/mL. Zatim je u fazi IIb ispitana učinkovitost i sigurnost primjene Evomele<sup>®</sup>. Objektivna stopa odgovora na lijek je 95%, a potpuni odgovor postignut je kod 31% pacijenata. Primijećene su gastrointestinalne nuspojave koje su povezane s primjenom visokih doza melfalana, a to su proljev, mučnina i povraćanje. Atrijska fibrilacija i akutno zatajenje bubrega pojavilo se kod samo 3 pacijenta (5%), pri čemu su pacijenti s atrijskom fibrilacijom imali hipertenziju ili hiperkolesterolemiju u povijesti bolesti. Smatra se da akutno zatajenje bubrega nije povezano s primjenom lijeka. Stopa pojavnosti oralnog mukozitisa nakon primjene Evomele<sup>®</sup> bila je samo 13%, dok se s

konvencionalnim formulacijama pojavljuje u čak 46% pacijenata (Hari i sur., 2015). Nažalost, kliničko ispitivanje je prekinuto ranije zbog pandemije koronavirusa ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).



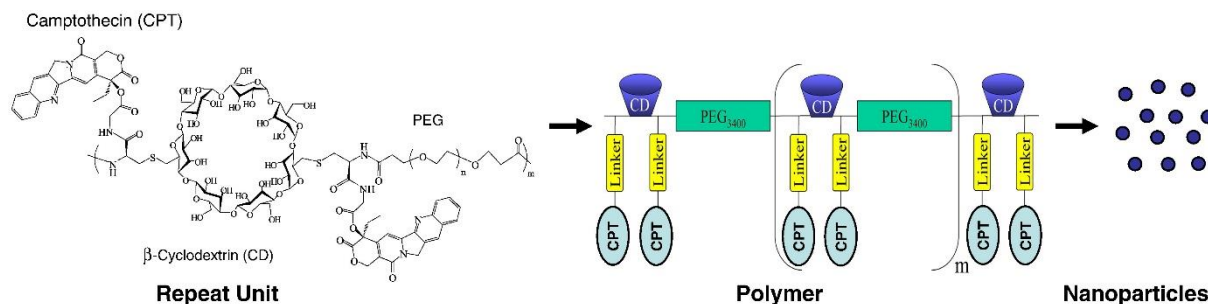
Slika 2. Usporedba farmakokinetičkih svojstava Evomela<sup>®</sup> i konvencionalne formulacije s propilenglikolom (Alkeran<sup>®</sup>) (preuzeto s [www.evomela.com](http://www.evomela.com))

#### 4.2.2 CRLX101

Kamptotecin (CPT) je alkaloid koji pokazuje antitumorsku aktivnost protiv nekoliko vrsta tumorskih stanica i životinjskih modela tumora. Međutim, CPT je slabo topljiv u vodi, a ima visoku sistemsku toksičnost pa se ne koristi u praksi. Osim toga, CPT u svojoj strukturi ima laktonski prsten koji kvantitativno hidrolizira pri fiziološkom pH do inaktivnog karboksilata koji se veže na albumin. Iako su iz njega proizvedeni derivati irinotekan i topotekan koji imaju bolju farmakokinetiku i farmakodinamiku, uporaba sva tri spoja ograničena je zbog toksičnosti ovisne o dozi (Gaur i sur., 2014).

CRLX101 je nanočestica izgrađena iz CPT i linearnog CD polimera. CD polimer ima dobru podnošljivost, odnosno tijekom testiranja na miševima nisu primijećene nuspojave (Pham i sur., 2014). Polimer se sastoji od podjedinica  $\beta$ -CD i PEG koje se izmjenjuju, a CPT je kovalentno vezan glicinskim mostom. Glicin je vezan na 20 -OH skupinu CPT, pri čemu stabilizira laktonski prsten i sprječava njegovo otvaranje. Susjedni polimerni lanci se spontano spajaju u nanočestice promjera 20-60 nm (Svenson i sur., 2011). U odnosu na slobodni CPT, CRLX101 ima 1000 puta veću topljivost u vodi, CPT je zaštićen od djelovanja metaboličkih enzima te je spriječena hidroliza laktona. Osim toga, zbog EPR učinka smanjena je sistemaska izloženost lijeku i posljedično toksične nuspojave CPT. CRLX101 se nakuplja u tumorskim tkivima, ulazi u tumorske stanice i tada se CPT polagano otpušta iz nanočestica tijekom

nekoliko dana (Gaur i sur., 2014). Nakon otpuštanja CPT, dolazi do raspada nanočestice na pojedinačne polimere veličine manje od 10 nm koji se izlučuju iz organizma putem bubrega (Young i sur., 2011).



Slika 3. Shematski prikaz nanočestica CRLX101 (preuzeto iz Svenson i sur., (2011) uz dopuštenje izdavača)

U pretkliničkim studijama na miševima s kolorektalnim karcinomom je pokazano da je koncentracija aktivnog CPT u tumorskim stanicama značajno veća ako se primjeni CRLX101 umjesto slobodnog CPT pa je tako nakon 24 h izmjerena koncentracija aktivnog CPT nakon primjene CRLX101 u tumoru  $183 \pm 115$  ng/mL, a nakon primjene slobodnog CPT  $1 \pm 0$  ng/mL. U miševa s karcinomom jajnika i rakom pluća došlo je do potpune remisije nakon primjene CRLX101, a pokazao se učinkovit i kod tumora koji su rezistentni na irinotekan (Svenson i sur., 2011). Ključna karakteristika ovih nanočestica je intracelularno otpuštanje lijeka pri čemu su studije na staničnim kulturama pokazale da nanočestice ulaze u tumorske stanice endocitozom, a zatim je oslobađanje CPT katalizirano esterazama iz endosoma i lizosoma (Young i sur., 2011).

U fazi I kliničkih ispitivanja, odnosno pri ispitivanju sigurnosti primjene CRLX101 na dobrovoljcima starijim od 18 godina s uznapredovalim malignim oboljenjima ( $n=62$ ), lijek je primjenjivan intravenozno svaka dva tjedna u 4 ciklusa primjene. Iz rezultata ove faze dobivena je preporučena doza CRLX101 koja iznosi  $15 \text{ mg/m}^2$ . Najčešće nuspojave su umor ( $n=23$ ), cistitis ( $n=17$ ), anemija ( $n=16$ ), neutropenija ( $n=13$ ), mučnina ( $n=12$ ), disurija ( $n=11$ ), hematurija ( $n=11$ ) i leukopenija ( $n=10$ ), a nuspojave poput ispadanja kose, smanjenog apetita, konstipacije, dehidracije i periferne neuropatije javile su se kod manje od 8% sudionika (Weiss i sur., 2013).

U fazi IIa kliničkih ispitivanja određuje se specifično doziranje lijeka, a rezultati su pokazali da je djelovanje CRLX101 najznačajnije kada se primjenjuje dugoročno, u malim dozama svaki dan. Pretpostavlja se da je za djelovanje CPT potrebno produljeno izlaganje

tumorskih stanica lijeku kako bi se osiguralo dovoljno vremena da se reverzibilni kompleksi koje CPT uzrokuje u procesu replikacije i transkripcije DNA pretvore u trajno oštećenje. Osim toga, produljeno izlaganje lijeku dovodi do inhibicije HIF-1 $\alpha$ , transkripcijskog faktora koji se inducira u stanju tumorske hipoksije, a koji pomaže preživljavanje tumorskih stanica i potiče angiogenezu (Weiss i sur., 2013).

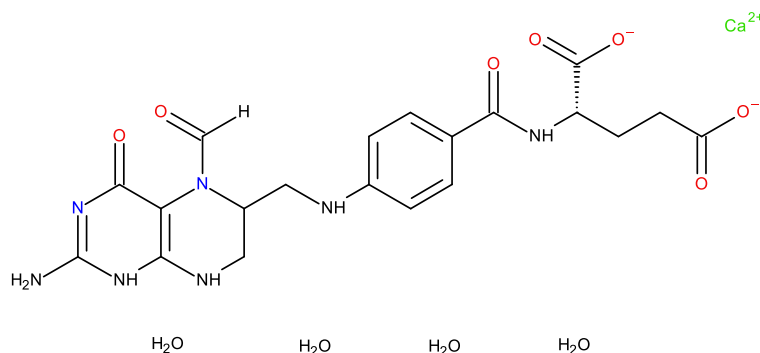
Kliničko ispitavanje u fazi II nastavilo se na različitim skupinama pacijenata. Na pacijentima s rakom pluća nemalih stanica uspoređivano je djelovanje CRLX101 u kombinaciji s najboljom suportivnom terapijom i same suportivne terapije. Nakon 12 mjeseci primjene lijeka objektivna stopa odgovora na CRLX101 iznosila je 6.2%, a na suportivnu terapiju 2% ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

CRLX101 se ispituje i u kombinaciji s drugim lijekovima. Bevacizumab, monoklonsko protutijelo koje veže VEGF i sprječava angiogenezu, ima relativno skromno antitumorsko djelovanje i malu stopu preživljenja. Pretpostavlja se da se zbog indukcije HIF-1 $\alpha$  u tumorskim stanicama razvila rezistencija na bevacizumab i slične lijekove. Kliničko istraživanje uspoređuje učinkovitost monoterapije CRLX101 i kombinacije CRLX101 s bevacizumabom u pacijenata s karcinomom jajnika, jajovoda i peritoneuma čije maligne bolesti pokazuju rezistenciju na platinu (Pharm i sur., 2014). Stopa kliničkog benefita, definirana kao udio pacijenata s uznapredovalim karcinomom koji postižu potpuni oporavak, djelomični oporavak ili stabilno stanje tijekom šest mjeseci, u monoterapiji iznosi 68%, a u kombinaciji s bevacizumabom čak 95%. Klinička studija pokazala je da je CRLX101 učinkovit i siguran za primjenu, sam ili u kombinaciji s bevacizumabom (Krasner i sur., 2021). Osim toga, CRLX101 se istražuje i u kombinaciji s drugim antineoplastcima poput kapecitabina, enzulatamida i paklitaksela.

#### **4.2.3 Deflexifol<sup>®</sup>**

Deflexifol<sup>®</sup> je formulacija 5-fluorouracila i leukovorina u kojoj je kao solubilizator korišten HP $\beta$ CD. Naime, kemoterapija metastatskog kolorektalnog karcinoma najčešće uključuje kombiniranu primjenu 5-FU i leukovorina pri čemu 5-FU djeluje kao inhibitor timidilat sintaze, a leukovorin pospješuje vezanje 5-FdUMP na timidilat sintazu i time pospješuje njegovo djelovanje (Glimelius i sur., 2021). Međutim, pri tome dolazi do fizikalne inkompatibilnosti između alkalne otopine 5-FU i kiselog leukovorina u obliku kalcijeve soli pri čemu se taloži ili 5-FU ili kalcijev karbonat. Kod čak 50% pacijenata taloženje kalcijevog karbonata dovodi do začepljenja katetera i prestanka primjene terapije. Ko-administracija ova

dva lijeka je učinkovitija od sekvencijske primjene pri čemu je ukupno preživljenje pacijenata nakon ko-administracije 22 mjeseca, a nakon sekvencijske primjene 11.7 mjeseci. Ipak, najčešće se primjenjuje sekvencijski kako bi se izbjegla inkompatibilnost (Clingan i sur., 2019).



Slika 4. Struktura kalcijeve soli leukovorina.

Upotrebom HP $\beta$ CD postiže se dobra topljivost 5-FU pri fiziološkom pH pa je spriječeno taloženje kalcijevog karbonata, a tako pripremljena otopina je stabilna. Koncentracija 5-FU i metabolita u plazmi bila je znatno veća nakon primjene Deflexifola<sup>®</sup> u odnosu na alkalnu otopinu 5-FU. Osim toga, Deflexifol<sup>®</sup> ima i bolji toksikološki profil; u fazi I kliničkog ispitivanja nije primijećena kardiotsičnost koja je karakteristična za primjenu alkalne otopine 5-FU, a najčešće nuspojave bile su iscrpljenost i mučnina blagog do umjerenog intenziteta (Clingan i sur., 2019). Zbog dobrog toksikološkog profila mogu se primijeniti čak 25% veće doze nego kod sekvencijske primjene ([www.fivephusion.com](http://www.fivephusion.com)). Vrijeme primjene Deflexifola<sup>®</sup> je znatno kraće od sekvencijske primjene pa se u obzir mora uzeti i ušteda koju bi ova formulacija mogla donijeti bolnicama (Clingan i sur., 2019).

#### 4.2.4 Sorafenib

Sorafenib je inhibitor kinaza koji se primjenjuje oralno u terapiji uznapredovalog karcinoma bubrega i neoperabilnog hepatocelularnog karcinoma. Međutim, bioraspoloživost sorafeniba nakon oralne primjene je samo 8.5%, najvećim dijelom zbog izrazito loše topljivosti lijeka u vodi. Kako bi se povećala topljivost sorafeniba dizajnirani su CD polimer i CD oligomer, a kao sredstvo za umrežavanje (eng. *crosslinker*) koristio se epiklorohidrin (EPI). Oba CD nanosustava pozitivno su utjecala na topljivost sorafeniba, ali spektroskopijom je pokazano da je oligomer učinkovitiji. Slobodan sorafenib ima topljivost u vodi 9,86 ng/mL, odnosno 0,02  $\mu$ M, a u prisutnosti CD oligomera topljivost se povećava na više od 80  $\mu$ M. Pretpostavlja se da je polimer manje učinkovit od oligomera jer steričke smetnje smanjuju dostupnost CD šupljina za stvaranje inkluzijskih kompleksa (Giglio i sur., 2018).



Sorafenib ima neuobičajene nuspojave poput zatajenja disanja i zatajenja jetre pa su se nakon intraperitonealne primjene kompleksa sorafeniba i CD oligomera uspoređivali histološki preparati pluća i jetre miševa s preparatima tkiva miševa nakon primjene slobodnog lijeka. Iako je prisutno određeno oštećenje alveola, kompleks s CD oligomerom pokazuje manje oštećenje od slobodnog sorafeniba. U usporedbi sa slobodnim sorafenibom, oba su kompleksa gotovo netoksična za jetru (Giglio i sur., 2018).

#### 4.2.5 NanoFEN

Fenretinid je sintetski derivat all-trans-retinoične kiseline koji *in vitro* pokazuje citotoksično djelovanje na tumorske stanice. Mehanizam njegovog djelovanja nije u potpunosti utvrđen, ali otkriveno je da djeluje na nekoliko signalizacijskih puteva čime smanjuje proliferaciju, inhibira stanični ciklus i potiče staničnu smrt. U dosadašnjim kliničkim ispitivanjima fenretinida (faze I-III) pokazana je minimalna sistemska toksičnost i dobra podnošljivost, ali i vrlo loša bioraspoloživost zbog niske topljivosti. Štoviše, u ispitivanju učinkovitosti nije bilo moguće postići ni najmanju djelotvornu koncentraciju u plazmi. Uklapanjem u CD, uz prethodno pretvaranje u sol za lakšu interakciju s CD, dobiva se NanoFEN koji ima >1000 puta veću topljivost u vodenom mediju od samog fenretinida. NanoFEN nakon intravenske ili peroralne primjene ima veću  $c_{max}$  i AUC od peroralno primijenjene soli fenretinida, a ima bolju topljivost i od PureFEN-a, otopine kojoj je dodan etanol za postizanje topljivosti. Treba napomenuti da PureFEN služi samo za usporedbu jer ga, zbog taloženja fenretinida, nije moguće intravenski primijeniti na ljudima. Podaci dobiveni farmakokinetičkim ispitivanjima prikazani su u tablici 2 (Orienti i sur., 2019).

Tablica 2. Koncentracije fenretinida u plazmi nakon primjene različitih formulacija fenretinida u dozi 5mg/kg (Orienti i sur., 2019)

	NanoFEN <i>i.v.</i>	NanoFEN <i>p.o.</i>	Sol fenretinida <i>p.o.</i>	PureFEN <i>i.v.</i>
$c_{max}$ (ng/mL)	6932,6	730,06	298,13	4134,77
AUC (h*ng/mL)	13656,8	9382,5	3209,7	6574,35

NanoFEN je ispitan na staničnim kulturama, kao i na ksenograftima kolorektalnog karcinoma i raka pluća. Pokazao je citotoksični učinak širokog spektra jer djeluje na signalizaciju koja je zajednička različitim vrstama tumora. Dva tjedna nakon prestanka primjene ksenografti liječeni konvencionalnom kemoterapijom pokazale su ubrzani ponovni rast tumorske mase, a ksenografti liječeni NanoFEN-om znatno manji rast. Naime, kod

retinoida je primijećen učinak utišavanja tumora koji ima potencijal spriječiti relaps i/ili stvaranje metastaza, posebice kod tumora koji se kasno otkrivaju poput raka dojke i raka prostate (Orienti i sur., 2019).

#### 4.2.6 Albendazol

Albendazol (ABZ) je antihelmintik koji se od 1975. koristi u liječenju infekcija crijevnim parazitima u ovaca i goveda, a 1982. odobrena je uporaba u ljudi. Slabo je topljiv u vodi pa se nakon peroralne primjene apsorbira samo 1-5 % doze, ovisno o udjelu masti u prehrani (Chai i sur., 2021). ABZ je pokazao i antitumorsko djelovanje u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima preko nekoliko mehanizama: inhibira rast i migraciju tumorskih stanica, ometa polimerizaciju tubulina, inducira apoptozu stanica, smanjuje angiogenezu te ometa transport i utilizaciju glukoze (Son i sur., 2020).

Međutim, parenteralna primjena ABZ nije moguća dok se ne postigne zadovoljavajuća topljivost. Pripremom nekoliko različitih formulacija ABZ s HP $\beta$ CD kao solubilizatorom, uočeno je da dodatak limunske kiseline uz CD dodatno povećava topljivost ABZ za 20%. Također, dodatkom askorbinske kiseline povećava se topljivost ABZ za 90%, a klorovodične kiseline za čak 820%, ali zbog niskog pH ove otopine nisu biokompatibilne. Otopina ABZ-CD-limunska kiselina nakon primjene na OVCAR-3 stanicama karcinoma jajnika znatno smanjuje broj nastalih kolonija stanica u odnosu na ABZ-etanol otopinu i kontrolu. Navedena formulacija postiže inhibiciju rasta stanica i pri nižim koncentracijama od etanolne otopine ABZ, vjerojatno zbog uklapanja limunske kiseline čime se stvara labilni kompleks koji lakše otpušta lijek. Istovremeno, u ispitivanju toksičnosti na humanim hepatocitima nije utvrđena smanjena vijabilnost stanica nakon korištenja ABZ, neovisno o tome koje otapalo je korišteno (Pourgholami i sur., 2008).

### 4.3 Smjerovi daljnjeg razvoja

Iako su CD poboljšali učinkovitost i sigurnost primjene citostatika, njihova uporaba još nije postigla svoj puni potencijal. U nastavku rada opisani su primjeri daljnjeg razvoja naprednih sustava za dostavu citostatika koji se temelje na CD, s naglaskom na ciljanu terapiju. Važno je naglasiti da su sljedeći sustavi u eksperimentalnim fazama.

Ciljana terapija je vrsta liječenja tumora u kojoj se lijekovi ili druge specifične molekule koriste kako bi se precizno identificirale i uništile samo određene vrste tumorskih stanica. Naime, tumorske stanice se razlikuju od normalnih po tome kakve receptore ekspimiraju na svojoj površini, po sastavu okoliša u kojem se nalaze i po tome koje gene nose. Ciljanim usmjeravanjem lijeka u tumorske stanice mogu se očuvati normalne stanice ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)), a time smanjiti nuspojave citostatika te unaprijediti kvaliteta života bolesnika.

#### 4.3.1 Ciljana terapija pomoću hijaluronske kiseline

Hijaluronska kiselina (HA) je glikozaminoglikan koji je jedan od glavnih sastojaka izvanstaničnog matriksa. Veže se na CD44 i RHAMM receptore koji su pojačano ekspimirani na tumorskim stanicama. Nedavno je otkriven način konjugacije HA i  $\beta$ -CD u jednom koraku što ga čini prikladnim za industrijsku proizvodnju (Singh i sur., 2021).

Za potrebe ispitivanja u HA- $\beta$ -CD je uklopljen doksorubicin (Dox). Pokazalo se da HA- $\beta$ -CD može uklopiti devet puta više Dox od samog  $\beta$ -CD što dovodi do učinkovitije dostave Dox u stanice. Nakon primjene HA- $\beta$ -CD-Dox krvotokom dolazi do tumorskih stanica, a zatim vezanje HA na CD44 receptore posreduje ulazak kompleksa u stanicu. Osim toga, ispitivanje je pokazalo da je HA- $\beta$ -CD-Dox kompleks stabilan pri fiziološkom pH, a da pri kiselom pH dolazi do naglog oslobađanja lijeka. S obzirom na to da je tumorski okoliš blago kiseo (pH $\approx$ 6.5), a unutrašnjost endosoma ima pH $\approx$ 4.5, Dox se oslobađa nakon ulaska u stanicu (Singh i sur., 2021).

Na HeLa stanicama provedeno je istraživanje poticanja apoptoze u kojemu je HA- $\beta$ -CD-Dox inducirao apoptozu u 83.3% stanica, a slobodni Dox u samo 28,1% što pokazuje koliko je sustav učinkovit u dostavi lijeka. Također, pokazano je da se nakon primjene HA- $\beta$ -CD-Dox manje Dox nakuplja u hepatocitima miševa u odnosu na akumulaciju nakon primjene slobodnog Dox iz čega se može zaključiti i da će hepatotoksičnost biti manja (Singh i sur., 2021). Sve ove rezultate potrebno je još potvrditi u kliničkim ispitivanjima.

### 4.3.2 Ciljana terapija pomoću folne kiseline

Folatni receptor (FR) je biomarker tumorskih stanica jer su FR pretjerano eksprimirani na stanicama velikog broja različitih tumora. Kada je FR prisutan na zdravim stanicama nalazi se samo s apikalne strane, odnosno nedostupan lijekovima koji putuju krvotokom. Tijekom tumorigeneze mijenja se struktura stanice pa se FR nalaze na cijeloj površini tumorskih stanica i time postaju dostupni kao meta za lijekove. Vežu folnu kiselinu (FA) koja je svim živim stanicama, a posebice tumorskim, potrebna za *de novo* sintezu purinskih baza i proliferaciju. Kako FA ulazi u stanicu endocitozom posredovanom vezanjem na FR, tako i konjugati s FA selektivno ulaze u tumorske stanice (Fernandez i sur., 2017).

Vezanjem FA na derivat  $\beta$ -CD dobivaju se FCD nanočestice koje prenose lijek na tumorske stanice s pretjeranom ekspresijom FR. U *in vivo* ispitivanju FCD čestica u njih je uklopljen paklitaksel, ranije spomenut jer se uobičajeno formulira uz pomoć Cremophor EL-a, tenzida koji *iv.* primjenom uzrokuje reakcije hiperosjetljivosti i druge nuspojave. Proizvedene su dvije vrste FCD nanočestica, a razlikuju se po mjestu vezanja folata, naboju i strukturi derivata. FCD-1 sadrže 14, a FCD-2 samo 7 alifatskih lanaca pa hidrofobniji FCD-1 ulazi u jače interakcije s paklitakselom. Osim toga, konjugacija s FA odvija se na suprotnim licima CD (Erdogar i sur., 2017).

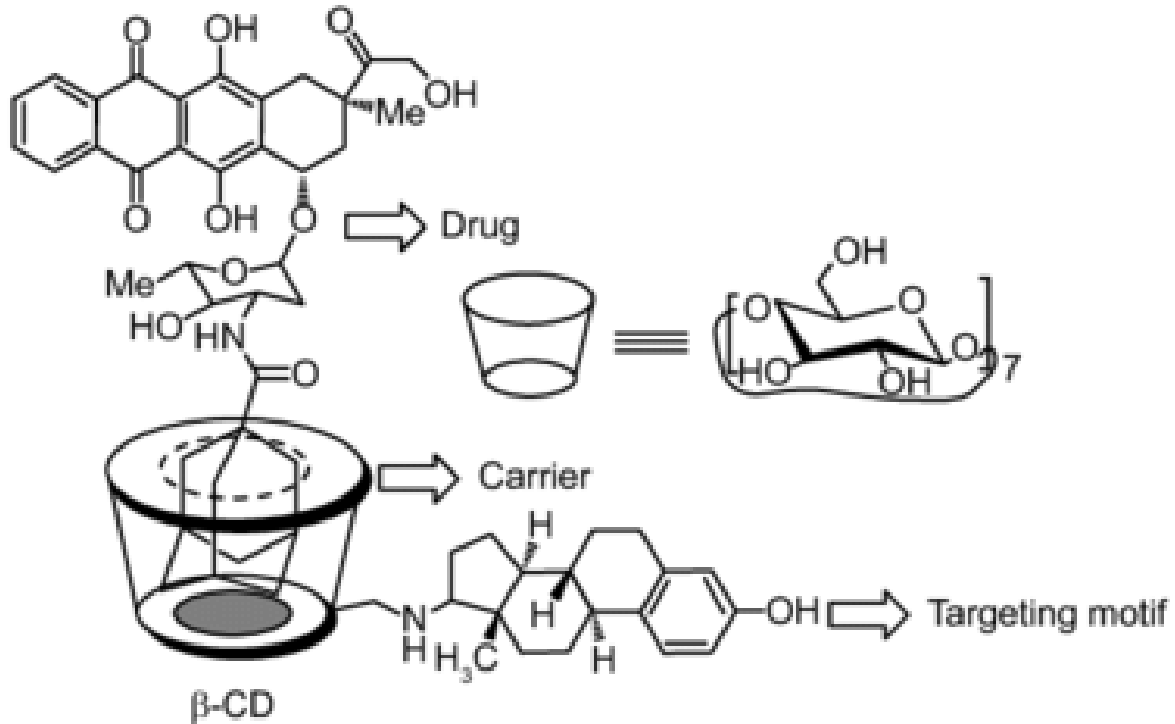
Antitumorsko djelovanje nanočestica dokazano je na 4T1 stanicama karcinoma dojke, a zatim je učinkovitost testirana na miševima. Podaci pokazuju da je FCD-1 učinkovitiji od formulacije s Cremophor EL i FCD-2 nanočestica, odnosno da je veća stopa preživljenja i manja masa tumora. Osim toga, smanjene su toksičnost i gubitak mase, a neki podaci upućuju na moguće sprječavanje metastaza (Erdogar i sur., 2017).

### 4.3.3 Ciljana terapija pomoću estrogenskih receptora

Estrogeni receptori (ER) pojačano su eksprimirani u više od 70% karcinoma dojke. Mogu se nalaziti u jezgri (nER), ali i na membrani endoplazmatskog retikuluma (mER) tumorskih stanica. CDE<sub>1</sub> je vektor koji cilja mER sastavljen iz  $\beta$ -CD i estrona, a u koji se može uklopiti kompleks adamantina i doksorubicina (Ada-Dox). Ada-Dox kompleks povezan je kovalentnom vezom, a Ada stvara inkluzijski kompleks s CDE<sub>1</sub> pa se Dox produljeno oslobađa dulje od 75 sati. Takva kinetika oslobađanja omogućuje produljeno djelovanje Dox i dugotrajnu inhibiciju proliferacije tumorskih stanica (Yin i sur., 2015).

Učinkovitost ulaska u stanicu pomoću ER ispitana je usporedbom CDE<sub>1</sub>-Ada-Dox s CD-Ada-Dox. Ispitivanje je pokazalo da je koncentracija CDE<sub>1</sub>-Ada-Dox veća od koncentracije CD-Ada-Dox samo kada je odnos CD i Dox 1:2, odnosno da je za postizanje poboljšanog ulaska

u stanicu potrebno prilagoditi omjer i dozu lijeka. Pretpostavlja se da pri nižim koncentracijama Dox dolazi do uklapanja estrona u CD šupljinu pa se ne može odviti vezanje CDE<sub>1</sub> i ER. Povećanjem koncentracije Dox nema mjesta za uklapanje estrona pa je tada interakcija s ER moguća (Yin i sur., 2015).



Slika 5. Struktura CDE<sub>1</sub>-Ada-Dox (preuzeto iz Yin i sur., (2015) uz dopuštenje izdavača)

#### 4.3.4 RGD tripeptid

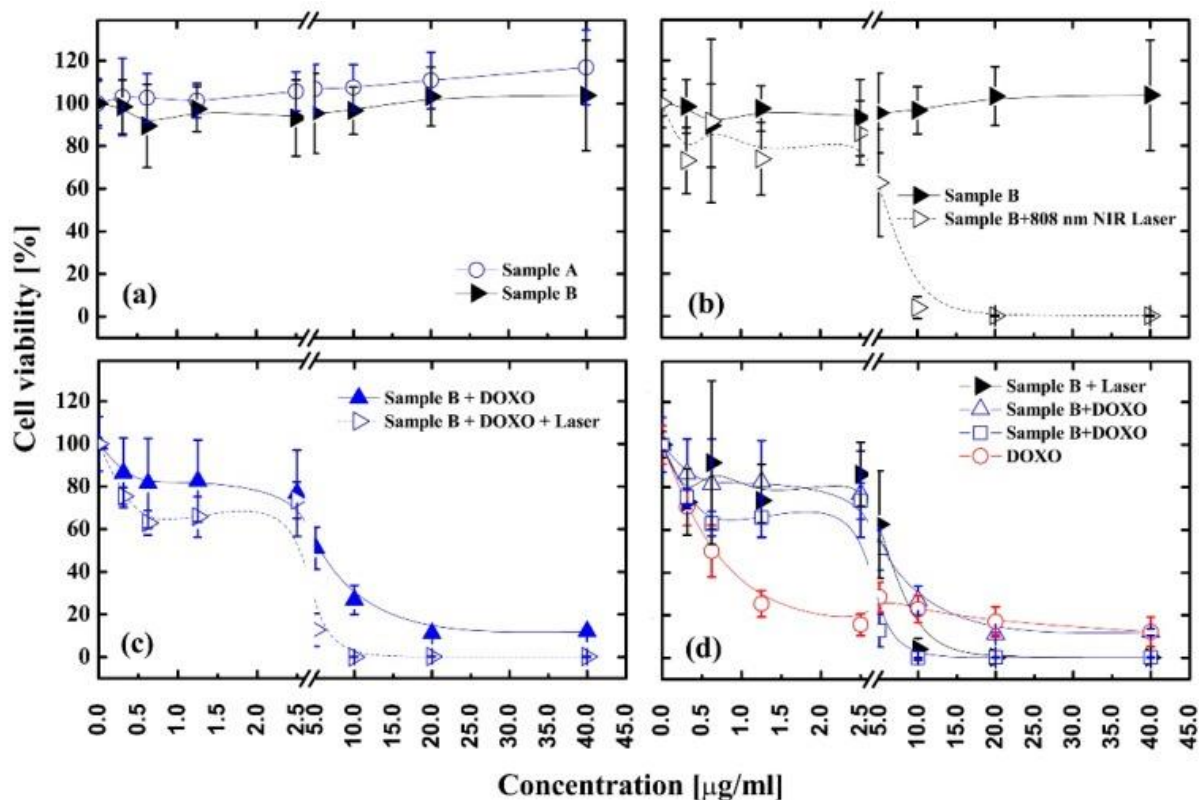
Integrini su podklasa adhezijskih molekula na površini stanica koje povezuju citoskelet s ekstracelularnim matriksom. Po građi su heterodimeri koji se sastoje iz nekovalentno povezanih  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica. Sisavci imaju gene za 18 različitih  $\alpha$  i 8  $\beta$  podjedinica, ali stvaraju se samo 24 vrste heterodimera koje vežu specifične ligande i tako pokreću kaskadu reakcija unutar stanica. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  pojačano je eksprimiran na nekim tumorskim stanicama i na stanicama novih krvnih žila unutar tumora. Veže brojne molekule izvanstaničnog matriksa poput kolagena, fibrinogena i fibronektina, a zajednički motiv tim molekulama je RGD tripeptid (arginil-glicil-asparaginska kiselina). Sudjeluje u procesima resorpcije kostiju posredovane osteoklastima, metastaziranja i angiogeneze gdje ima ključnu ulogu. Monoklonska protutijela koja ciljaju integrin  $\alpha_v\beta_3$  postigla su indukciju apoptoze tumorskih stanica i inhibiciju angiogeneze što, uz pojačanu ekspresiju, čini integrin  $\alpha_v\beta_3$  pogodnim markerom za ciljanu dostavu citostatika u tumorske stanice (Liu i sur., 2008).

Razvijene su CD nanočestice modificirane dodatkom RGD tripeptida, a zatim je u njih uklopljen doksorubicin. Modifikacija se postiže stvaranjem kovalentne veze između adamantina i RGD peptida, a zatim Ada stvara inkluzijski kompleks s  $\beta$ -CD koji je sastavni dio CD polimera ili CD oligomera. Istraživanje je uspoređivalo antiproliferativni učinak oCD-Dox, pCD-Dox, oCD-AdaRGD-Dox i pCD-AdaRGD-Dox. Pokazalo se da je dodatak AdaRGD povećao antiproliferativni učinak Dox, kao i da je učinak jači kod CD oligomera. Ipak, povećanje učinkovitosti ovisilo je o omjeru RGD i Dox što se može objasniti time da su pri testiranju korištene različite vrste tumorskih stanica koje imaju različitu ekspresiju integrina (Viale i sur., 2018).

#### 4.3.5 Magnetne nanočestice

Magnetne nanočestice koriste se u dijagnostici i terapiji pri čemu se korištenjem vanjskog magneta mogu dovesti do ciljnog područja, odnosno do solidnog tumora koji je blizu površine kože. Polidopamin (PDA) je polimer koji se koristi za termalnu ablaziju tumorskih stanica, a lako se veže i na hidrofilne i na hidrofobne površine. PDA apsorbira NIR (eng. *near infrared*) svjetlost valne duljine 808 nm što uzrokuje povišenje temperature. Međutim, sama fototermalna terapija jako teško može ukloniti cijeli tumor. Kombinacijom CD s magnetskim svojstvima i PDA dobivene su  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@SH-\beta\text{CD}$ , čestice koje uklapanjem lijeka mogu kombinirati kemoterapiju s fototermalnom terapijom (Mrowczynski i sur., 2018).

Navedene čestice imaju visoku učinkovitost uklapanja lijekova zbog prisutnosti  $\beta$ -CD pa je u njih uklopljen doksorubicin. Stabilne su pri fiziološkoj pH, a pri kiselom pH (4.5-5.5) dolazi do sporog i produljenog otpuštanja Dox. Pri koncentraciji od 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA@SH-\beta\text{CD}@Dox$  čestice djeluju učinkovitije od samog Dox na HepG2 stanice karcinoma jetre. U kombinaciji s NIR laserom dolazi do značajnog smanjenja vijabilnosti tumorskih stanica što je prikazano na slici 6 (Mrowczynski i sur., 2018).



Slika 6. Smanjenje vijabilnosti tumorskih stanica nakon primjene magnetskih nanočestica; uzorak A predstavlja Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA, a uzorak B Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@SH-βCD (preuzeto iz Mrowczynski i sur., (2018) uz dopuštenje izdavača)

#### 4.3.6 Dostava gena

Genska terapija obuhvaća tri glavne skupine: zamjenu gena, uređivanje gena i terapiju T stanicama koje su proizvedene uz pomoć genetskog inženjeringa. Zamjena gena daje pacijentu novi gen koji kod njega ne postoji ili je oštećen, dok se uređivanjem gena može ubaciti, izbaciti, promijeniti ili zamijeniti dio genetskog koda pacijenta. Iako je genetska terapija obećavajuća i genetski materijal sve dostupniji, dostava gena je izazovna. Trenutno se za dostavu gena koriste virusni vektori koji su skupi, imunogenični i mogu ući u interakcije s nekim lijekovima poput antikoagulansa (Haley i sur., 2020).

CD mogu prenositi genetski materijal pri čemu se DNA kondenzira unutar CD šupljine. Najčešće se koristi karboksimetil-β-CD, komercijalno dostupan derivat, ali mogu se koristiti drugi kationski i amfilni derivati CD. Postignut je uspjeh u prijenosu DNAza koje mogu ciljano suprimirati gene (Haley i sur., 2020).

Iako sami CD mogu dostaviti gene do tumorskih stanica, uglavnom se koriste kao dio sustava za dostavu pri čemu utječu na fizikalno-kemijska svojstva sustava. Genetski materijal

se uklapa u šupljinu CD ili veže na neku drugu komponentu sustava, ali tada CD imaju druge važne uloge poput održavanja stabilnosti ili omogućavanja izlaska gena iz endosoma u citoplazmu. Osim toga, u CD se mogu uklopiti drugi lijekovi pa takvi sustavi imaju potencijal za dostavu kombinacijske terapije (Haley i sur., 2020).

Primjer sustava za dostavu kombinacijske terapije je polimerna četkica koja prenosi gen za p53 i doksorubicin pri čemu Dox izravno ulazi u interakciju sa staničnom DNA i uzrokuje smrt stanice, a p53 je tumorski supresor. S obzirom na to da i gen i Dox trebaju doći do jezgre, dodatak Dox je jednostavan i ne zahtijeva optimizaciju sustava. Osim kemoterapije, mogu se pakirati imunomodulatori, citokini ili monoklonska protutijela (Haley i sur., 2020).

Neke je sustave koji su dizajnirani za monoterapiju moguće pretvoriti u sustave za dostavu kombinacijske terapije. Primjerice, DNAza pakirana u  $\beta$ -CD pokazuje samo 10-20% učinkovitost u ubijanju tumorskih stanica, ali kada se kombinira s Dox dolazi do sinergističkog učinka. Također, kationske nanokapsule s uklopljenim tamoksifenom koriste se za liječenje raka dojke, a zbog kationskog polimera moguće je uklapanje gena. Iako nema puno ovakvih primjera, pametnom uporabom već dostupnih sustava za dostavu mogu se poboljšati učinci terapije i otvoriti vrata za personalizaciju terapije u budućnosti (Haley i sur., 2020).



## 5. ZAKLJUČCI

CD su ekscipijensi sa sve većim značajem u farmaceutskoj industriji. Koriste se kao solubilizatori jer stvaraju inkluzijske komplekse s hidrofobnim molekulama. Netoksičnost i mogućnost stvaranja nanostrukture daju im prednost nad većinom komercijano dostupnih pomoćnih tvari. Citostatici su većinom netopljive molekule pa se CD mogu koristiti u razvoju novih formulacija te pri tom postići bolju bioraspoloživost i manju toksičnost.

Melfalan se u konvencionalno korištenoj formulaciji otapa uz pomoć propilen glikola, su-otapala koje uzrokuje ozbiljne nuspojave. Korištenjem SBE $\beta$ CD poboljšava se topljivost melfalana i smanjuje učestalost i ozbiljnost nuspojava što je potvrđeno kliničkim ispitivanjem.

Kamptotecin se zbog slabe topljivosti i visoke sistemske toksičnosti ne koristi u praksi, a problem je i stabilnost laktonskog prstena pri fiziološkom pH. U kombinaciji s CD polimerom nastaju CRLX101 nanočestice 1000 puta veće topljivosti i male sistemske toksičnosti. Laktonski prsten kamptotecina zaštićen je glicinskim mostom pa je onemogućena hidroliza, a uklapanje u CD štiti lijek od enzimske razgradnje.

5-FU ima bolji učinak kada se primjenjuje u kombinaciji s leukovorinom, ali su zbog razlike u pH otopina inkompatibilni za ko-administraciju. Uporabom HP $\beta$ CD za povećanje topljivosti 5-FU pri fiziološkoj pH izbjegava se razlika u pH i omogućava istodobna primjena.

CD povećavaju topljivost i drugim lijekovima, ali daljnji razvoj usmjeren je na napredne sustave za dostavu lijekova. CD je relativno lako modificirati pa se na njih mogu vezati ligandi receptora specifičnih za tumorske stanice ili polimeri različitih svojstava. Raznovrsnost CD derivata omogućava mnogobrojna istraživanja pa se u budućnosti očekuje široki spektar njihove primjene i posljedično veća sigurnost i učinkovitost citostatika.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

5-FdUMP – 5-fluorodeoksiuridin monofosfat

5-FU – 5-fluorouracil

ABZ – albendazol

Ada – adamantin

ADI – *acceptable daily intake* (prihvatljivi dnevni unos)

AUC – *area under the curve* (površina ispod krivulje)

CD – ciklodekstrini

CPT – kamptotecin

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

Dox – doksorubicin

EKG – elektrokardiogram

EPI – epiklorohidrin

EPR – *enhanced permeability and retention* (povećana permeabilnost i retencija)

ER – estrogenski receptor

FA – folna kiselina

FR – folatni receptor

GRAS – *generally accepted as safe* (općenito prihvaćeno kao sigurno)

HA – hijaluronska kiselina

HIF-1 $\alpha$  – *hypoxia-induced factor* (faktor induciran hipoksijom)

HP $\beta$ CD – hidroksipropil  $\beta$ -ciklodekstrin

mER – membranski estrogenski receptor

MIP – *molecular imprinting* (molekularno otiskivanje)

nER – jezgreni estrogenski receptor

NIR – *near infrared*

PDA – polidopamin

PEG – polietilenglikol

RGD – arginil-glicil-asparaginska kiselina

RM $\beta$ CD – *randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin* (nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin)

RNA – ribonukleinska kiselina

SPE $\beta$ CD – sulfopropil eter  $\beta$ -ciklodekstrin

VEGF – *vascular endothelial growth factor* (vaskularni endotelni faktor rasta)

## 7. LITERATURA

A Phase 2 Study of CRLX101(NLG207) in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer, 2011.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01380769?term=crlx101&draw=2&rank=2>,

pristupljeno 31.5.2022.

Aljitawi OS, Ganguly S, Abhyankar SH, et al. Phase IIa cross-over study of propylene glycol-free melphalan (LGD-353) and alkeran in multiple myeloma autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(8), 1042-1045.

Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 2017, 8(23), 2-3.

Cancer, 2019. [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1), pristupljeno 22.10.2021.

Chai JY, Jung BK, Hong SJ. Albendazole and Mebendazole as Anti-Parasitic and Anti-Cancer Agents: an Update. *Korean J Parasitol*, 2021, 59(3), 189-225.

Clingan PR, Ackland SP, Brungs D, et al. First-in-human phase I study of infusional and bolus schedules of Deflexifol, a novel 5-fluorouracil and leucovorin formulation, after failure of standard treatment. *Asia Pac J Clin Oncol.*, 2019, 15(3), 151-157.

Committee for Human Medicinal Products (CHMP), Cyclodextrins used as excipients, EMA/CHMP/333892/2013, 2017.

Di L, Fish P, Mano T. Bridging solubilize between drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 2012, 17, 486-495.

Erdoğan N, Esendağlı G, Nielsen T, Esendağlı-Yılmaz G, Yöyen-Ermiş D, Erdoğan B, Sargon M, Eroğlu H, Bilensoy E. Therapeutic efficacy of folate receptor-targeted amphiphilic cyclodextrin nanoparticles as a novel vehicle for paclitaxel delivery in breast cancer. *Journal of Drug Targeting*, 2017

Fernández M, Javaid F, Chudasama V. Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers. *Chem Sci*, 2017, 9(4), 790-810.

Gandhi SR, Quintans JSS, Gandhi GR, Araújo AAS, Quintans Júnior LJ. The use of cyclodextrin inclusion complexes to improve anticancer drug profiles: a systematic review. *Expert Opin Drug Deli*, 2020, 17(8), 1069-1080.

Gaur S, Wang Y, Kretzner L, et al. Pharmacodynamic and pharmacogenomic study of the nanoparticle conjugate of camptothecin CRLX101 for the treatment of cancer. *Nanomedicine*. 2014, 10(7), 1477-1486.

Gidwani B, Vyas A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *Biomed Res Int*. 2015, 198268.

Giglio V, Viale M, Bertone V, Maric I, Vaccarone R, Vecchio G. Cyclodextrin polymers as nanocarriers for sorafenib. *Invest New Drugs*, 2018; 36(3); 370-379.

Glimelius B, Stintzing S, Marshall J, Yoshino T, Gramont A. Metastatic colorectal cancer: Advances in the folate-fluoropyrimidine chemotherapy backbone. *Cancer Treatment Reviews*, 2021, 98, 102218.

Haimhoffer A et al. Cyclodextrins in Drug Delivery Systems and Their Effects on Biological Barriers. *Scientia Pharmaceutica*, 2019, 87, 3-13

Haley RM, Gottardi R, Langer R, Mitchell MJ. Cyclodextrins in drug delivery: applications in gene and combination therapy. *Drug Deliv Transl Res*. 2020; 10(3); 661-677.

Hari P, Aljitawi OS, Arce-Lara C, et al. A Phase IIb, Multicenter, Open-Label, Safety, and Efficacy Study of High-Dose, Propylene Glycol-Free Melphalan Hydrochloride for Injection (EVOMELA) for Myeloablative Conditioning in Multiple Myeloma Patients Undergoing Autologous Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(12), 2100-2105.

Jansook P, Ogawa N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 535 (1-2), 272-284.

Jones D, Dressman J, Loftsson T et al. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2016, 68(5), 544-555

Katzung B. G. Lijekovi za liječenje malignih bolesti. U: Temeljna i klinička farmakologija, Zagreb, 2020, str. 948-976.

Krasner CN, Campos SM, Young CL, et al. Sequential Phase II clinical trials evaluating CRLX101 as monotherapy and in combination with bevacizumab in recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2021, 162(3), 661-666.

Lawrie TA, Winter-Roach BA, Heus P, Kitchener HC. Adjuvant (post-surgery) chemotherapy for early stage epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 12, 2-15.

Liu Z, Wang F, Chen X. Integrin  $\alpha(v)\beta(3)$ -Targeted Cancer Therapy. *Drug Dev Res*. 2008, 69(6), 329-339.

Masood S. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancers. *Womens Health (Lond)*, 2016, 12(5), 480-491.

Mrówczyński, R.; Jędrzak, A.; Szutkowski, K.; Grześkowiak, B.F.; Coy, E.; Markiewicz, R.; Jesionowski, T.; Jurga, S. Cyclodextrin-Based Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy. *Nanomaterials* 2018, 8, 170.

Narvekar M, Xue HY, Eoh JY, Wong HL. Nanocarrier for poorly water-soluble anticancer drugs--barriers of translation and solutions. *AAPS PharmSciTech*. 2014, 15(4), 822-833.

Nikitenko N, Prassolov V. Non-Viral Delivery and Therapeutic Application of Small Interfering RNAs. *Acta naturae*, 2013, 5, 35-53.

Orienti I, Francescangeli F, De Angelis ML, et al. A new bioavailable fenretinide formulation with antiproliferative, antimetabolic, and cytotoxic effects on solid tumors. *Cell Death Dis.* 2019; 10(7), 529.

Pham E, Birrer MJ, Eliasof S, et al. Translational impact of nanoparticle-drug conjugate CRLX101 with or without bevacizumab in advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2015, 21(4), 808-818.

Pourgholami MH, Wangoo KT, Morris DL. Albendazole-cyclodextrin complex: enhanced cytotoxicity in ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 2008, 28(5A), 2775-2779.

Propylene Glycol-Free Melphalan Hydrochloride (Evomela) in AL Amyloidosis Patients, 2016. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02994784>, pristupljeno 21.6.2022.

Saokham, P.; Muankaew, C.; Jansook, P.; Loftsson, T. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. *Molecules*, 2018, 23, 1161.

Singh P, Chen Y, Tyagi D, Wu L, Ren X, Feng J, Carrier A, Luan T, Tang Y, Zhang J, Zhang X.  $\beta$ -Cyclodextrin-grafted hyaluronic acid as a supramolecular polysaccharide carrier for cell-targeted drug delivery. *Int J Pharm*, 2021, Volume 602, 2021, 120602.

Son DS, Lee ES, Adunyah SE. The Antitumor Potentials of Benzimidazole Anthelmintics as Repurposing Drugs. *Immune Netw.* 2020, 20(4), e29.

Svenson S, Wolfgang M, Hwang J, Ryan J, Eliasof S. Preclinical to clinical development of the novel camptothecin nanopharmaceutical CRLX101. *J Control Release*, 2011, 153(1), 49-55.

Šekerija M. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019., *Bilten 44*, 2021

Targeted Therapy, 2021. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/targeted-therapy/what-is.html> pristupljeno 10.8.2022.

Tumor. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 22. 10. 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=62675>

Viale M, Tosto R, Giglio V, et al. Cyclodextrin polymers decorated with RGD peptide as delivery systems for targeted anti-cancer chemotherapy. *Invest New Drugs*, 2019, 37(4); 771-778.

Weiss GJ, Chao J, Neidhart JD, et al. First-in-human phase 1/2a trial of CRLX101, a cyclodextrin-containing polymer-camptothecin nanopharmaceutical in patients with advanced solid tumor malignancies. *Invest New Drugs*, 2013, 31(4), 986-1000.

Yin J, Shumyak S, Burgess C, Zhou Z, He Z, Zhang X, Pan S, Yang T, Duan W, Qiu J, Zhou S. Controllable drug uptake and nongenomic response through estrogen-anchored cyclodextrin drug complex. *Int J Nanomed*, 2015, 10, 4717–4730.

Young C, Schluep T, Hwang J, Eliasof S. CRLX101 (formerly IT-101)-A Novel Nanopharmaceutical of Camptothecin in Clinical Development. *Curr Bioact Compd*. 2011, 7(1), 8-14.

## 8. SAŽETAK

Onkološke bolesti su drugi uzrok smrtnosti u svijetu, a broj oboljelih raste. Terapija tumora uništava i zdrave, normalne stanice, osobito one koje se brzo dijele što dovodi do brojnih nuspojava. Citostatici su većinom slabo topljivi u vodi pa ih je teško formulirati, a pomoćne tvari koje se koriste u tu svrhu često uzrokuju dodatne nuspojave. Ciklodekstrini omogućuju povećanje topljivosti citostatika bez izazivanja novih nuspojava. To su biokompatibilni ciklički oligosaharidi izgrađeni iz  $\alpha$ -1,4-D-glukopiranoznih jedinica. Strukture su šupljeg krnjeg stošca čija je unutrašnjost hidrofobna, a vanjšina hidrofilna. Uklapanjem slabo topljivih lijekova u svoju šupljinu povećavaju im topljivost, maskiraju okus i miris lijeka, sprječavaju iritaciju gastrointestinalnog trakta ili sprječavaju interakcije s drugim lijekovima.

CD se primjenjuju kao solubilizatori pri čemu povećavaju bioraspoloživost citostatika, a smanjuju im toksičnost. Klinička ispitivanja melfalana uklopljenog u CD pokazala su objektivnu stopu odgovora od 95%, a teške nuspojave koje se povezuju s konvencionalnom formulacijom melfalana izbjegnute su. CD polimeri s kamptotecinom stvaraju CRLX101 nanočestice koje imaju do 1000 puta veću topljivost, a zbog EPR učinka smanjena je sistemska toksičnost. Klinička ispitivanja CRLX101 pokazala su stopu kliničkog benefita od 68% za monoterapiju i čak 95% za kombinaciju s bevacizumabom. Također, CD se koriste i kako bi se spriječila inkompatibilnost alkalne otopine 5-FU s kiselim leukovorinom. Naime, CD omogućavaju topljivost 5-FU pri fiziološkoj pH vrijednosti pa se, osim reakcije neutralizacije, izbjegava i kardiotoksičnost povezana s primjenom alkalne otopine. Razvijaju se i istražuju napredni sustavi dostave citostatika u tumorske stanice pri čemu se CD modificiraju za ciljanu dostavu ili lakše uklapanje gena.



## 8. SUMMARY

Oncological diseases are the second leading cause of death worldwide, with a growing number of patients. Tumor therapy also destroys healthy normal cells, especially ones that divide quickly, which leads to numerous adverse effects. Cytostatics are usually poorly soluble in water which makes them hard to formulate and other excipients often cause additional adverse effects. Cyclodextrins can be used to improve drug solubility without aggravating side effects. Cyclodextrins are biocompatible cyclic oligosaccharides built from  $\alpha$ -1,4-D-glucopyranose units. Spatially, they form an inverted hollow truncated cone, the interior of which is hydrophobic, and the exterior is hydrophilic. By fitting poorly soluble drugs into their cavity, they increase their solubility, mask the taste and smell of the drug, prevent irritation of the gastrointestinal tract or prevent interactions with other drugs.

CDs are used as solubilizers, increasing the bioavailability of cytostatics and reducing their toxicity. Clinical trials of melphalan incorporated into CD have shown an objective response rate of 95%, and the severe side effects associated with conventional melphalan formulation have been avoided. CD polymers create CRLX101 nanoparticles with camptothecin that have up to 1000 times greater solubility, and due to the EPR effect, systemic toxicity is reduced. Clinical trials of CRLX101 showed a clinical benefit rate of 68% for monotherapy and even 95% for the combination with bevacizumab. Also, CDs are used to prevent the incompatibility of the alkaline solution of 5-FU with the acidic leucovorin. Namely, CDs enable the solubility of 5-FU at a physiological pH value, so, in addition to the neutralization reaction, the cardiotoxicity associated with the use of an alkaline solution is also avoided. Advanced delivery systems for cytostatics to tumor cells are being developed and investigated, whereby CDs are modified for targeted delivery or easier gene insertion.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku tehnologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Primjena ciklodekstrina u razvoju terapijskih sustava za dostavu antitumorskih lijekova

Martina Nikolin

#### SAŽETAK

Onkološke bolesti su drugi uzrok smrtnosti u svijetu, a broj oboljelih raste. Terapija tumora uništava i zdrave, normalne stanice, osobito one koje se brzo dijele što dovodi do brojnih nuspojava. Citostatici su većinom slabo topljivi u vodi pa ih je teško formulirati, a pomoćne tvari koje se koriste u tu svrhu često uzrokuju dodatne nuspojave. Ciklodekstrini omogućuju povećanje topljivosti citostatika bez izazivanja novih nuspojava. To su biokompatibilni ciklički oligosaharidi izgrađeni iz  $\alpha$ -1,4-D-glukopiranoznih jedinica. Strukture su šupljeg krnjeg stošca čija je unutrašnjost hidrofobna, a vanjština hidrofilna. Uklapanjem slabo topljivih lijekova u svoju šupljinu povećavaju im topljivost, maskiraju okus i miris lijeka, sprječavaju iritaciju gastrointestinalnog trakta ili sprječavaju interakcije s drugim lijekovima.

CD se primjenjuju kao solubilizatori pri čemu povećavaju bioraspodivnost citostatika, a smanjuju im toksičnost. Klinička ispitivanja melfalana uklopljenog u CD pokazala su objektivnu stopu odgovora od 95%, a teške nuspojave koje se povezuju s konvencionalnom formulacijom melfalana izbjegnute su. CD polimeri s kamptotecinom stvaraju CRLX101 nanočestice koje imaju do 1000 puta veću topljivost, a zbog EPR učinka smanjena je sistemska toksičnost. Klinička ispitivanja CRLX101 pokazala su stopu kliničkog benefita od 68% za monoterapiju i čak 95% za kombinaciju s bevacizumabom. Također, CD se koriste i kako bi se spriječila inkompatibilnost alkalne otopine 5-FU s kiselim leukovorinom. Naime, CD omogućavaju topljivost 5-FU pri fiziološkoj pH vrijednosti pa se, osim reakcije neutralizacije, izbjegava i kardiotoksičnost povezana s primjenom alkalne otopine. Razvijaju se i istražuju napredni sustavi dostave citostatika u tumorske stanice pri čemu se CD modificiraju za ciljanu dostavu ili lakše uklapanje gena.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 36 stranica, 6 grafičkih prikaza, 2 tablice i 43 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ciklodekstrini, citostatici, topljivost, solubilizatori, parenteralni pripravci

Mentor: **Dr. sc. Mario Jug**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mario Jug**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Sandra Jurić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of pharmaceutical technology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### The use of cyclodextrins in the development of therapeutic delivery systems for antitumor drugs

Martina Nikolin

#### SUMMARY

Oncological diseases are the second leading cause of death worldwide, with a growing number of patients. Tumor therapy also destroys healthy normal cells, especially ones that divide quickly, which leads to numerous adverse effects. Cytostatics are usually poorly soluble in water which makes them hard to formulate and other excipients often cause additional adverse effects. Cyclodextrins can be used to improve drug solubility without aggravating side effects. Cyclodextrins are biocompatible cyclic oligosaccharides built from  $\alpha$ -1,4-D-glucopyranose units. Spatially, they form an inverted hollow truncated cone, the interior of which is hydrophobic, and the exterior is hydrophilic. By fitting poorly soluble drugs into their cavity, they increase their solubility, mask the taste and smell of the drug, prevent irritation of the gastrointestinal tract or prevent interactions with other drugs.

CDs are used as solubilizers, increasing the bioavailability of cytostatics and reducing their toxicity. Clinical trials of melphalan incorporated into CD have shown an objective response rate of 95%, and the severe side effects associated with conventional melphalan formulation have been avoided. CD polymers create CRLX101 nanoparticles with camptothecin that have up to 1000 times greater solubility, and due to the EPR effect, systemic toxicity is reduced. Clinical trials of CRLX101 showed a clinical benefit rate of 68% for monotherapy and even 95% for the combination with bevacizumab. Also, CDs are used to prevent the incompatibility of the alkaline solution of 5-FU with the acidic leucovorin. Namely, CDs enable the solubility of 5-FU at a physiological pH value, so, in addition to the neutralization reaction, the cardiotoxicity associated with the use of an alkaline solution is also avoided. Advanced delivery systems for cytostatics to tumor cells are being developed and investigated, whereby CDs are modified for targeted delivery or easier gene insertion.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 36 pages, 6 figures, 2 tables and 43 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cyclodextrins, cytostatics, solubility, solubilizers, parenteral dosage forms

Mentor: **Mario Jug, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mario Jug, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Ivan Pepić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Sandra Jurić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2022.