

Nanotehnologija pri zdravljenju raka

Nanotechnology in the treatment of cancer

Bojana Mirković,¹ Tamara Lah Turnšek,² Janko Kos^{1,3}

¹ Fakulteta za farmacijo,
Univerza v Ljubljani,
Aškerčeva 7, 1000
Ljubljana

² Nacionalni inštitut za
biologijo, Večna pot 111,
1000 Ljubljana

³ Institut Jožef Stefan,
Jamova 39, 1000
Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

Bojana Mirković,
Katedra za farmacevtsko
biologijo, Fakulteta za
farmacijo, Aškerčeva 7,
1000 Ljubljana, e-pošta:
bojana.mirkovic@ffa.
uni-lj.si

Ključne besede:

rak, nanotehnologija,
nanodostavni sistem,
ciljana terapija,
nanotoksikologija

Key words:

cancer; nanotechnology;
nanoparticles;
targeted drug delivery;
nanotoxicology

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2010;
79: 146–155

Prispelo: 15. sept. 2009,
Sprejeto: 20. nov. 2009

Izveček

Izhodišča: Zdravljenje rakavih bolezni s kemoterapijo ima zaradi neselektivnega delovanja citostatikov na deleče se zdrave celice številne neželene učinke. Zaradi pojava neželenih učinkov je včasih potrebno odmerek zdravila prilagoditi, ob hujših neželenih učinkih pa je zdravljenje potrebno celo prekiniti, kar proces zdravljenja podaljša in lahko vpliva na izid. Neželeni učinki kemoterapije poslabšajo tudi kakovost življenja bolnika med samim zdravljenjem in tudi po njem. Z vključevanjem protitumorskih učinkovin v nanodostavne sisteme (NS), ki pasivno in/ali aktivno ciljajo tumorske celice, se temu lahko izognemo.

Zaključki: Vključevanje protitumorskih učinkovin v NS poveča zadrževanje učinkovine na mestu tumorja zaradi pasivnega ciljanja (učinka EPR), ki je posledica povečane prepustnosti tumorskega žilja. Še večjo selektivnost za tumorske celice dosežemo s pripenjanjem specifičnih ligandov na površino NS, ki selektivno prepoznajo čezmerno izražene antigene ali receptorje na tumorskih celicah. Na ta način se zmanjša medsebojno delovanje protitumorskih učinkovin z zdravimi celicami. Formulacije protitumorskih učinkovin v NS imajo manj neželenih učinkov in so varnejše v primerjavi s prosto učinkovino, kar omogoča povišanje odmerka in tako izboljša učinkovitost zdravljenja. Do danes sta Evropska agencija za zdravila (EMA) in Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) za zdravljenje rakavih bolezni odobrili devet zdravil na osnovi NS. Kljub odobritvam pa varnost NS še ni zadostno raziskana. Toksičnost NS povezujejo z

nastankom reaktivnih kisikovih presnovkov, k toksičnim učinkom NS pa naj bi pomembno prispevalo tudi medsebojno delovanje s celicami imunskega sistema in nezadostna specifičnost NS.

Abstract

Background: Chemotherapy can induce severe side effects in patients due to nonselective activity towards healthy cells during the treatment of cancer. This can lead to an alteration of the dosage regimen and in some cases to premature cancellation of chemotherapy, which reduces its therapeutic effect and prolongs the treatment period. Adverse side effects can also influence the patient's quality of life during and after the treatment. Inclusion of anti-tumour drugs in nanocarrier systems can reduce the adverse side effects by passive and/or active targeting of tumour cells.

Conclusions: Nanocarrier systems achieve passive targeting of tumours through enhanced permeability and retention effect (EPR effect), which is mainly the result of leakiness of tumour vasculature. Furthermore, active targeting of tumour cells can be achieved through the conjugation of targeting ligands to the surface of nanoparticles, which selectively bind antigens or receptors overexpressed on the surface of tumour cells. In this way, the interaction between healthy tissue and anti-tumour drugs is reduced. Consequently, anti-tumour drugs formulated in nanocarriers have less side-effects and are safer in comparison with a free drug, thus enabling higher doses and better efficacy of anti-tumour therapy. To date, European

Medicines Agency (EMA) and Food and Drug Administration (FDA) have approved nine nanocarrier-based medicines for the treatment of cancer. The safety of nanopar-

ticles is yet to be fully explored. However, their toxicity is known to be enhanced with reactive oxygen species, which are associated with inflammation.

Uvod

Rak je skupno ime za raznoliko skupino bolezni, katerih glavna značilnost je nadzorovana rast spremenjenih, t. j. rakavih celic.¹ Leta 2005 je na območju Republike Slovenije (RS) za rakom umrlo 5119 ljudi,² kar ga uvršča na drugo mesto med vzroki umrljivosti v Sloveniji, takoj za boleznimi obtočil.³ Vzroki za nastanek raka so različni in vključujejo genetske in okoljske dejavnike, povzročitelje okužb ter staranje.⁴

Nastanek in razvoj raka lahko opišemo kot večstopenjski proces, ki se odraža v obliki genetskih sprememb, ki povzročijo preoblikovanje normalnih, zdravih celic v tumorske celice. Tumorski fenotip zajema šest osnovnih lastnosti, ki omogočajo rast malignih tumorjev: neodvisnost od zunanjih rastnih dejavnikov, neodzivnost na dejavnike, ki zavirajo rast, zmožnost izoginitve apoptozi, sposobnost neomejene delitve celic, sposobnost spodbujanja angiogeneze in tumorsko invazijo ter metastaziranje. Prav slednje je odgovorno za kar 90 % smrti, povezanih z rakom.⁵

Zdravljenje rakavih bolezni najpogostejše obsega kirurško odstranitev tumorja, radioterapijo in sistemsko zdravljenje raka s kemoterapijo, ki vključuje citostatike, hormonska in biološka zdravila. Glavna slabost zdravljenja s citostatiki so neželeni učinki zaradi citotoksičnega delovanja na hitro delče se celice zdravih tkiv. Med njihove neželene učinke prištevamo slabost in bruhanje, izgubo teka, zaprtje, drisko, vnetje sluznic, alopecijo, sekundarne novotvorbe, nevtropenijo, ki pri bolnikih z rakom pomeni dodatno tveganje za okužbo, in toksične učinke na pljuča, jetra, srce ter spolne organe. Zaradi pojava neželenih učinkov je včasih potrebno odmerke zdravila prilagoditi, ob hujših neželenih učinkih pa je včasih zdravljenje potrebno celo prekiniti, kar proces zdravljenja podaljša in lahko vpliva na izid. Neželeni učinki kemoterapije bistveno vplivajo tudi na kakovost življenja bolnika med samim

zdravljenjem in tudi po njem.⁶ Z uporabo nanodostavnih sistemov (NS), ki pasivno in/ali aktivno ciljajo tumorske celice, se temu lahko izognemo.⁷

Nanotehnologija, nanomedicina in nanodostavni sistemi

Izraz nanotehnologija označuje multidisciplinarni pristop k načrtovanju, izdelavi, karakterizaciji in uporabi materialov, struktur, naprav in sistemov z obvladovanjem snovi v nanomerilu.⁸ Pri tem se predpona nano- uporablja, kadar ima nek material ali struktura vsaj eno dimenzijo v območju 1–100 nm. Kljub temu v strokovni literaturi k NS (nanodelcem, ki se uporabljajo kot dostavni sistem za učinkovine) prištevamo tudi delce velikosti do 1 μm . V nano območju se fizikalne, kemične in biološke lastnosti materialov značilno razlikujejo od lastnosti izhodnega »makro« materiala, kar je izhodišče za njihovo uporabo.⁹

Uporaba nanotehnologije v medicinski namene se imenuje nanomedicina in obsega uporabo materialov ter naprav v nanomerilu za diagnosticiranje, preprečevanje in zdravljenje bolezni. Zajema vse od izboljšave stabilnosti in topnosti zdravilnih učinkovin do ciljne dostave učinkovin ter diagnosticiranja *in vivo*.¹⁰ Formulacija zdravilnih učinkovin v NS ima številne prednosti pred prostimi učinkovinami: varovanje učinkovine pred prezgodnjo razgradnjo, preprečevanje prezgodnjega medsebojnega delovanja učinkovine z okoljem, izboljšanje prodiranja učinkovine v določeno tkivo (npr. tumor), omogočanje nadziranega sproščanja učinkovine in izboljšanje dostave učinkovin v celice.⁷ Glavni namen uporabe NS pri zdravljenju raka je selektivna dostava protitumorskih učinkovin tumorskim celicam, s čimer se zmanjša verjetnost resnih neželenih učinkov, s katerimi se običajno srečujejo bolniki z rakom in izboljša učinkovitost zdravljenja na račun večjega odmerka zdravila. Z uporabo

NS se izboljšata tudi complianca bolnikov in kakovost življenja med zdravljenjem in po njem. Dodatna prednost NS je možnost izogitve odpornosti na kemoterapevtike, ki je resen omejitveni dejavnik pri protitumorskem zdravljenju.¹¹

Najbolj raziskani NS so polimerni nanodelci velikosti od 10 do 1000 nm, ki so pripravljani iz sinteznih polimerov, kot so poliglikolna kislina, polimlečna kislina in poli(mlečna-glikolna) kislina, ali iz naravnih polimerov, kot sta hitosan in kolagen. Sestavljeni so iz nosilnega ogrodja, v katerih je učinkovina raztopljena ali dispergirana ali na katere je učinkovina adsorbirana ali kovalentno vezana.^{7,12,13} Sproščanje učinkovine iz nanodelca poteka nadzorovano preko površinske erozije polimernega matriksa ali preko difuzije skozi matriks. Čeprav na trgu ni prisotnega nobenega polimernega nanodelca za dostavo protitumorskih učinkovin, se številni polimerni nanodelci nahajajo v fazi predkliničnih in kliničnih raziskav.⁷ Kar je ogrodje nanodelca sestavljeno iz proteinov (npr. albumina), govorimo o proteinskih nanodelcih. Če pa je ogrodje nanodelca sestavljeno iz mono-, di- in trigliceridov in voskov ter maščobnih kislin, pa govorimo o trdnih lipidnih nanodelcih. Prednost obeh sistemov je njuna biokompatibilnost in biorazgradljivost.¹⁴

Med bolj raziskane NS sodijo tudi lipidni nanodelci (liposomi in miceli), ki imajo številne ugodne lastnosti, kot so biokompatibilnost, biorazgradljivost in sposobnost vključevanja hidrofobnih in hidrofilnih učinkovin.⁷ Liposomi so sferični lipidni vezikli velikosti od 20 nm do 4 µm, ki so lahko sestavljeni iz enega ali več koncentričnih lipidnih dvoslojev in enakega števila prostorov z vodo. Hidrofilne učinkovine se vgrajujejo v vodni medij v osrednjem delu liposoma, medtem ko se hidrofozne učinkovine vgrajujejo v lipidni dvosloj. Evropska agencija za zdravila (EMA) in Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) sta do danes odobrili že štiri pripravke za zdravljenje raka na osnovi liposomov (Tabela 1), zaradi česar so liposomi najbolj zastopani NS pri zdravljenju raka.^{7,10,15} Miceli so sferični koloidni delci nanometrskih velikosti (≤ 50 nm), ki so podobno kot liposomi sestavljeni iz amfifilnih

molekul. Njihova struktura pa je različna od fosfolipidov v liposomih, zato v vodnih medijih tvorijo micelle s hidrofobnim jedrom in hidrofilnim plaščem in ne koncentričnih lipidnih dvoslojev. Zaradi njihove strukture, ki omogoča vgradnjo hidrofobnih učinkovin, se uporabljajo predvsem za pripravo formulacij v vodi slabo topnih učinkovin.¹⁰

Posebna skupina so NS so polimerni konjugati, to so molekule polimera, na katere so kovalentno vezani proteini ali nizkomolekularne zdravilne učinkovine. Polimerno komponento NS najpogosteje predstavljajo linearni polimeri, kot so polietilenglikol (PEG), N-(2-hidroksipropil)metakrilamid kopolimer in poliglutaminska kislina.¹⁶ Polimer izbire pri večini proteinskih konjugatov je PEG, dobro poznana farmacevtska pomožna snov, ki ni toksična in ne imunogena. Konjugacija proteinov s hidrofilnimi verigami PEG poveča stabilnost in topnost proteinov ter zmanjša njihovo imunogenost, ledvični očistek in privzem v celice retikuloendotelijskega sistema (RES). S PEG konjugirani protein se dalj časa zadržuje v krvi, kar zmanjša potrebo po pogostem odmerjanju zdravila. Nizkomolekularne učinkovine se običajno naključno porazdeljujejo po telesu, kar je glavni vzrok za neželene učinke kemoterapevtikov. Temu se lahko izognemo s pripravo polimernih konjugatov, ki se dalj časa zadržujejo v krvi in v večji meri na mestu tumorja.¹⁷ Za zdravljenje rakavih bolezni so odobrena tri zdravila na osnovi polimernih konjugatov, njihovo število pa naj bi se v naslednjih nekaj letih še povečalo (Tabela 1).

Na področju NS veliko obetajo dendrimeri. Gre za globulame, polimerne nanodelce z dobro opredeljeno strukturo nanometrskih velikosti (10–100 nm) in visoko stopnjo razvejanosti. Njihova zgradba omogoča vgrajevanje učinkovin v prostore znotraj dendrimera, funkcionalne skupine na površini dendrimera pa poleg pripenjanja učinkovin omogočajo tudi pripenjanje ligandov za aktivno ciljanje tumorskih celic.¹⁰

NS so lahko tudi anorganskega izvora. Mednje prištevamo zlate nanokapsule, ogljikove nanocevke ter magnetne in porozne silicijeve nanodelce. Zlate nanokapsule so nanodelci, ki jih sestavlja s plastjo zlata obdano jedro iz silicijevega oksida. Zlato je

Tabela 1: NS za zdravljenje raka, ki sta jih odobrili FDA in/ali EMEA.^{7,10,16,17,25–29}

Ime zdravila	Zdravilna učinkovina	Vrsta NS	Indikacija
Abraxane®	paklitaksel	paklitaksel, vezan na albuminske nanodelce	metastazirani rak dojke
Doxil®/Caelyx®	doksorubicin	liposomi STEALTH®	Kaposijev sarkom, metastazirani rak dojke, rak jajčnikov, multipli mielom v kombinaciji z bortezomibom
DaunoXome®	daunorubicin	liposomi	Kaposijev sarkom
Myocet®	doksorubicin	liposomi	v kombinaciji s ciklofosfamidom za zdravljenje metastazirane oblike raka dojke, Kaposijev sarkom, rak jajčnikov
Neulasta®	PEG-granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (G-CSF)	polimerni konjugat s proteinom	preprečevanje nevtropenije, povezane s kemoterapijo
Oncaspar®	PEG-L-asparaginaza	polimerni konjugat s proteinom	akutna limfoblastna levkemija
Ontak®	fuzijski protein interlevkina-2 z difterija toksinom	imunotoksin (fuzijski protein)	kutani T-celični limfom
Zinostatin Stimalmer®	kopolimer stirena in anhidrida maleinske kisline, konjugiran z neokarzinostatinom (SMANCS)	polimerni konjugat s proteinom	hepatocelularni karcinom

biokompatibilen material, katerega valenčni elektroni (plazmoni) ob obsevanju s svetlobo določene valovne dolžine nihajo. S spreminjanjem razmerja med debelino plasti zlata in velikostjo jedra lahko vplivamo na valovno dolžino optične resonance nanodelca. Zlate nanokapsule lahko po obsevanju s svetlobo ustrezne valovne dolžine to absorbirajo ali razpršijo. V prvem primeru pride do segrevanja delca ($\Delta T \sim 30\text{--}35^\circ\text{C}$), kar se lahko izkoristi za termično uničenje tumorskih celic, medtem ko razpršitev svetlobe omogoča slikanje tumorjev. Zlate nanokapsule tako omogočajo hkrati zdravljenje in diagnosticiranje bolezni.¹⁸ Podoben način delovanja imajo magnetni nanodelci iz železovega oksida (Fe_2O_3), ki prav tako omogočajo termoterapijo in slikanje tumorjev hkrati, vendar pa magnetni nanodelci sproščajo toploto po izpostavitvi alternirajočemu magnetnemu polju.¹⁹

Ogljikove nanocevice lahko opišemo kot cilindrične strukture, sestavljene iz benzenovih obročev.²⁰ Sodijo v družino fullerenov, ki poleg diamanta, grafita in aktivnega oglja predstavljajo eno od alotropskih oblik ogljika. Glede na strukturo jih delimo na enoslojne ogljikove nanocevice, ki imajo premer 0,4–2,0 nm in so dolge 20–1000 nm in večslojne ogljikove nanocevice, ki imajo premer

1,4–100 nm in so dolge 1 do več μm . Nefunkcionalizirane nanocevice imajo hidrofbni značaj in so netopne v vodnih medijih, zato se običajno derivatizirajo, pri čemer nastanejo vodotopni konjugati.²¹

Porozni silicijevi nanodelci so biokompatibilni in biorazgradljivi nanodelci iz silicijevega dioksida, ki imajo satovju podobno porozno strukturo. Njihova velikost se giblje od 50 do 300 nm, pore pa so lahko velike od 2 do 6 nm. Silicijevi nanodelci imajo zaradi porozne strukture visoko zmogljivost vključevanja ali adsorpcije učinkovin in možnost nadzorovanega sproščanja učinkovin. Za razliko od ostalih organskih NS so bolj odporni na toploto, pH, mehanski stres in hidrolizo. Porozni silicijevi nanodelci se internalizirajo v celice s pinocitozo in s klatrinom posredovano endocitozo.²²

Ciljana dostava nanodostavnih sistemov do tumorskih celic

Selektivno ciljanje tumorskih celic in tumorskega tkiva z NS lahko dosežemo na dva načina, pasivno in aktivno. Pasivno ciljanje tumorjev je posledica učinka povečane prepustnosti in zadrževanja, tj. učinek EPR (*angl.* enhanced permeability and retention

effect). Ko trdni tumorji dosežejo velikost 2–3 mm³, postane izmenjava hranil in kisika med tumorjem in njegovim okoljem otežena. Da bi lahko nemoteno rasel naprej, se v tumorju sprožijo procesi angiogeneze. Zaradi hitre angiogeneze se novo nastalo žilje močno razlikuje od normalnega, saj je nepravilne strukture in visoko prepustno s številnimi fenestracijami velikosti od 100 nm do 2 µm. Gladkomišična plast je pogosto odsotna, zaradi česar je svetlina tumorskega žilja v stanju stalne dilatacije, odtekanje limfe pa je oteženo. Posledica omenjenih lastnosti je povečana ekstrapazacija in zadrževanje NS na mestu tumorja, saj zdravo žilje drugod po telesu zanje ni prepustno. Na nizkomolekularne učinkovine učinek EPR ne deluje, saj slednje po vstopu v tumor hitro oddifundirajo nazaj v krvni obtok in se odstranijo skozi ledvice.^{7,11,23,24}

Aktivno ciljanje tumorskih celic temelji na pripenjanju ligandov na površino NS, ki specifično prepoznajo (in se vežejo na) molekule na površini tumorskih celic (antigen ali receptor) ter na ta način omogočajo selektivno zadrževanje NS na mestu tumorja. Ligande za aktivno ciljanje delimo na proteine (protitelesa in njihove fragmente), nukleinske kisline (aptamere) in ostale ligande (peptide, vitamine in ogljikove hidrate).^{7,11}

Uporaba monoklonskih protiteles, ki specifično prepoznajo antigene, povezane s tumorskimi celicami, je eden pogostejših sistemov za aktivno ciljanje tumorskih celic z NS. V ta namen se lahko uporabljajo cela protitelesa ali pa le njihovi delci (Fab, Fab' in scFv). Pri tem morajo biti izpolnjeni štirje pogoji: antigen mora biti bolj izražen na tumorskih kot na zdravih celicah, antigen mora igrati pomembno vlogo pri napredovanju bolezni, na površini celic se mora nahajati v stabilni obliki in mora biti prisoten na čim večjem deležu tumorskih celic in pri čim večjem deležu tumorjev različnega tipa.^{7,11} Protitelesa, zlasti živalskega izvora, so imunogena. Himerna, humanizirana in humana protitelesa sicer zmanjšajo verjetnost imunskega odziva, vendar pogosto na račun zmanjšane afinitete protiteles. Na afiniteto protitelesa lahko vpliva tudi konjugacija protitelesa na površino NS. Poleg imunogenosti in načina konjugacije je uporaba protiteles omejena tudi s prosto

krožečimi antigeni v krvnem obtoku, z nezadostnim prodiranjem v tumor in z morebitno spremembo antigena v času. Zato se farmacevtska tehnologija vse bolj usmerja tudi v druge načine aktivnega ciljanja tumorjev.¹¹

Tumorske celice na svoji površini čezmerno izražajo receptorje za rastne faktorje in vitamine. Ti jim omogočajo vzdrževanje proliferacije in metabolizma na visoki ravni. Tak primer je receptor za žilnoendotelijski rastni faktor-2 (VEGFR-2), ki je čezmerno izražen na površini endotelijskih celic tumorskega žilja. Uporaba VEGF ali proti VEGFR-2 usmerjenih protiteles kot ligandov za aktivno ciljanje onemogoči vezavo naravnega liganda na receptor in omogoči z receptorjem posredovano endocitozo NS. Ker vezava VEGF na VEGFR-2 sproži angiogenezo, poleg aktivnega ciljanja tumorja dosežemo tudi antiangiogeni učinek. Na podobnem pristopu temelji aktivno ciljanje tumorskih celic preko transferinskih in folatnih receptorjev. Oba receptorja sta v primerjavi z normalnimi celicami v večji meri izražena na površini tumorskih celic. Transferin je serumski glikoprotein, ki služi prenosu železa do celic, medtem ko je folna kislina vitamin, ki je potreben za sintezo gradnikov DNK (purinov in pirimidinov). Konjugacija folne kisline ali transferina na NS s protitumorsko učinkovino izboljša znotrajcelično dostavo učinkovine in s tem učinkovitost zdravljenja. Glavna slabost teh sistemov je, da te receptorje izražajo tudi hitro rastoče zdrave celice, kot so fibroblasti, epiteljske in endotelijske celice, kar pomeni večjo toksičnost in manjšo učinkovitost protitumorskega zdravljenja.^{7,11}

Nanodostavni sistemi, odobreni za terapijo raka

Do danes je bilo za klinično uporabo odobrenih že 24 zdravil, izdelanih z nanotehnologijo. Njihova prodaja pa je presegla 5,4 milijard dolarjev. Večina NS so liposomi in polimerni konjugati (80 %).²⁵ NS za zdravljenje raka, ki sta jih odobrili FDA in/ali EMEA, so navedeni v Tabeli 1. Sledi podrobnejši opis zdravil za zdravljenje raka z NS, ki so odobrena v EU.

Abraxane®

Abraxane® je indiciran za zdravljenje metastatskega raka na dojki pri bolnicah, pri katerih je bilo zdravljenje prve izbire neuspešno, ali pri bolnicah, pri katerih zdravljenje z antraciklinom ni indicirano. Zdravilo vsebuje 130 nm velike nanodelce človeškega serumskega albumina, konjugiranega s paklitakselom, in ima bistveno drugačne lastnosti od drugih formulacij paklitaksela.^{26,30} Paklitaksel je slabo vodotopna učinkovina, ki se v klasičnih formulacijah zaradi povečanja topnosti nahaja v mediju iz etanola in makrogolglicerol ricinolata (1:1) in se pred infundiranjem redči s fiziološko raztopino ali 5-odstotno raztopino glukoze. Klasična formulacija zahteva uporabo posebnih vsebnikov brez di(2-etilheksil)ftalata, dolgotrajno infundiranje (3 ure) in predmedikacijo s kortikosteroidi (deksametazon) in antihistaminiki (difenhidramin, cimetidin, ranitidin) za preprečevanje preobčutljivostnih reakcij. Predmedikacija z antihistaminiki in kortikosteroidi je vir številnih medsebojnih delovanj z zdravili, ki jih bolnik prejema poleg paklitaksela.³¹ Kovalentna vezava paklitaksela na albumin poveča topnost paklitaksela in omogoča njegovo dajanje brez sočasne uporabe toksičnih organskih topil.¹⁰ S tem se izognemo uporabi posebnih vsebnikov, podaljšanemu času infuzije (ta se skrajša na 30 minut) in predmedikaciji. Na albumin vezani paklitaksel je tako varnejši in omogoča povečanje odmerka za kar 50 %, kar je eden od razlogov za večjo učinkovitost zdravljenja. Večjo učinkovitost lahko pripišemo tudi večjemu zadrževanju na mestu tumorja. To je posledica učinka EPR in medsebojnega delovanja albumina z albondinom, glikoproteinom na površini endotelijskih celic, ki inducira endotelijsko transcitozo.^{30,32}

Doxil®, Caelyx® in Myocet®

Doxil® je bil prvi liposomski pripravek, ki ga je za zdravljenje Kaposijevega sarkoma leta 1995 odobrila FDA. Zdravilo Doxil® je pod imenom Caelyx® prisotno tudi na območju EU. Poleg Kaposijevega sarkoma je indicirano za zdravljenje metastaziranega raka dojke, raka jajčnikov in multiplega mieloma v kombinaciji z bortezomibom. Caelyx®/Doxil® je pegiliran liposomski pripravek

doksorubicinijskega klorida, ki ima zaradi drugačne formulacije učinkovine spremenjen farmakokinetični profil kot standardni pripravek doksorubicinijskega klorida. Slednji imajo hiter očistek in se izdatno porazdeljujejo po tkivih, medtem ko se v liposome vgrajeni doksorubicin zadržuje predvsem v krvnem obtoku in na mestu tumorja zaradi učinka EPR. Zaradi spremenjenega porazdeljevanja ima Caelyx®/Doxil® v primerjavi s standardnimi pripravki doksorubicinijskega klorida manj izrazite neželene učinke, kot so kardiotoskičnost, lokalna toksičnost, slabost, bruhanje, nevtropenija in alopecija. Med neželenimi učinki, ki so pri Caelyx®/Doxil® bolj izraženi kot pri prosti učinkovini, so stomatitis, mukozitis in palmarno-plantarna eritrodizestezijska. Ti učinki so večinoma blagi, vendar lahko v hujših primerih privedejo do podaljšanja ali celo do prekinitve zdravljenja.^{27,33}

Myocet® je liposomski pripravek doksorubicinijskega klorida, ki na površini liposomov ne vsebuje verig PEG. Indiciran je za zdravljenje raka jajčnikov, Kaposijevega sarkoma ter metastazirane oblike raka dojke v kombinaciji s ciklofosfamidom.^{7,28} Myocet® ima podobno kot Caelyx®/Doxil® spremenjen profil porazdeljevanja, pri čemer se v manjši meri porazdeli v srce in sluznico prebavil kot standardni pripravek doksorubicina, zaradi česar ima manj izrazite neželene učinke. Ob zdravljenju z Myocetom® se lahko pojavijo naslednji neželeni učinki: okužba, nevtropenična vročica, nevtropenija, trombocitopenija, anemija, slabost, bruhanje, mukozitis, stomatitis, diareja, alopecija, utrujenost in lokalna toksičnost.²⁸

Neulasta®

Neulasta® vsebuje pegiliran granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (PEG-GCSF), ki se uporablja za preprečevanje nevtropenije, ki je posledica kemoterapije. Kovalentna modifikacija GCSF s PEG podaljša plazemski razpolovni čas in zmanjša imunogenost proteina. Zato se PEG-GCSF daje le enkrat, in sicer na drugi dan cikla kemoterapije, medtem ko je za isti učinek pri nepegiliranem GCSF zdravilo potrebno dajati dva tedna vsak

dan.¹⁷ Med pogostejše neželene učinke Neulaste® prištevamo bolečine v kosteh, alergijske reakcije, zvišanje vrednosti sečne kisline, alkalne fosfataze in laktat-dehidrogenaze, slabost, splenomegalijo, bolečine na mestu injiciranja, bolečine v prsih, glavobol, artralgijo, mialgijo, bolečine v hrbtu, udih in vratu.²⁹

Zunaj meja EU se poleg zdravil Abraxane® in Neulasta® za zdravljenje raka uporabljajo še naslednja zdravila z NS: Doxil®, DaunoXome®, Oncaspar®, Ontak® in Zinostatin Stimalmer®. DaunoXome® je liposomska formulacija daunorubicinijevega citrata, ki jo je FDA za zdravljenje Kaposijevega sarkoma odobrila pol leta kasneje kot Doxil®. Formulacija daunorubicina v liposome zaščiti učinkovino pred kemijsko in encimsko razgradnjo, zmanjša vezavo proteinov in privzem učinkovine v zdrava tkiva. V študijah, opravljenih na živalih, so ugotovili, da se DaunoXome® predvidoma zaradi učinka EPR v večji meri zadržuje na mestu tumorja kot prosta učinkovina. Glavni neželeni učinki zdravila DaunoXome® so mielosupresija, kardiotsičnost, lokalna toksičnost, alopecija, slabost in bruhanje.³⁴ Zdravilo Oncaspar®, ki vsebuje pegilirano obliko encima L-asparaginaze, se uporablja za zdravljenje akutne limfoblastne levkemije. Nativna oblika encima lahko povzroči preobčutljivostne reakcije in ima sorazmerno nizek plazemski razpolovni čas (8–30 ur), ki zahteva vsakodnevno dajanje zdravila 4 tedne. Pegilirana oblika encima je manj imunogena kot nativna in ima daljši plazemski razpolovni čas (14 dni), kar omogoča enkratno dajanje zdravila na 2 tedna. Ob zdravljenju z zdravilom Oncaspar® se lahko pojavijo naslednji neželeni učinki: alergijske reakcije, hiperglikemija, pankreatitis, tromboza, hiperbilirubinemija, povišana raven transaminaz in koagulopatija.^{16,17,35} Zdravilo Ontak® je fuzijski protein interleukina-2 (IL-2) s toksinom difterije in je indicirano za zdravljenje kožnega T-celičnega limfoma. Fuzijski protein se preko fragmenta IL-2 veže na receptor za IL-2 na površini malignih celic. Vezava povzroči z receptorjem posredovano endocitozo in znotrajcelično sprostitve toksina difterije, ki je nosilec citotoksičnega učinka. Zdravljenje z zdravilom Ontak® lahko povzroči naslednje neželene učinke: povišano telesno tempera-

turo, slabost, utrujenost, bruhanje, diarejo, glavobol, periferni edem, kašelj, dispnejo, pruritus, sindrom kapilarnih razpok, infuzijske reakcije in motnje vida.³⁶ Zinostatin Stimalmer® je zdravilo, ki se od leta 1994 uporablja za zdravljenje hepatocelularnega karcinoma na Japonskem. Zdravilo vsebuje proteinsko učinkovino neokarzinostatin, kovalentno vezano na kopolimer stirena in anhidrida maleinske kisline. Neokarzinostatin je znan po izraziti mielosupresiji in težavnem dajanju, saj zahteva skrbno spremljanje hitrosti infundiranja. Kovalentna modifikacija zmanjša imunogenost proteina, izboljša njegovo stabilnost in podaljša plazemski razpolovni čas ter poveča zadrževanje proteina na mestu tumorja zaradi učinka EPR. S kovalentno modifikacijo zagotovimo tudi njegovo topnost v hidrofobnem kontrastnem sredstvu Lipiodol®, ki nam omogoča dajanje zdravila naravnost v jetrno arterijo ter s tem zmanjšanje neželenih učinkov neokarzinostatina. Med pogostejše neželene učinke zdravila sodijo povišana telesna temperatura, bolečina v trebuhu in mrzlica ter prehodno povišanje vrednosti encima alanin-transaminaze. Dajanje v jetrno arterijo tudi lahko povzroči resnejše neželene učinke, kot so okvare jetrnega žilja in atrofija jeter, ki lahko v resnejših primerih vodijo v jetrno odpoved.^{16,17,37}

Neželeni učinki nanodostavnih sistemov pri zdravljenju raka

Nanotehnologija že dolgo časa omogoča številne novosti tako pri zdravljenju rakavih bolezni kot tudi na številnih drugih področjih. Kljub temu pa se o varnosti uporabe nanodelcev sprašujemo šele danes. To lepo ponazori dejstvo, da od 1,2 milijarde dolarjev, ki jih v ZDA namenijo nanotehnološkim raziskavam, le 1 % porabijo za raziskave o varnosti nanodelcev in njihovem vplivu na zdravje in okolje. Z varnostnim vidikom nanotehnologije se ukvarja sorazmerno nova veda nanotoksikologija, ki proučuje molekularne mehanizme toksičnosti nanodelcev in mehanizme vstopa nanodelcev v telo ter ocenjuje tveganje ob izpostavljenosti nanodelcem.^{10,38}

Lastnosti nanodelcev, kot so velikost, velika specifična površina, kemijska sestava,

topnost in geometrija, ki so sicer zaslužne za njihove pozitivne učinke, so hkrati tudi osnova za njihove toksične učinke. Od vseh naštetih naj bi bili velikost in specifična površina najbolj zaslužni za toksične učinke nanodelcev. Velikost delcev v nanomerilu vpliva na fizikalno-kemijske lastnosti materiala in tudi na medsebojno delovanje z biološkimi tkivi. Prve in druge se značilno razlikujejo od lastnosti materiala v makromerilu. Z zmanjševanjem velikosti nanodelcev se povečuje njihova specifična površina, kar pomeni, da se večje število atomov ali molekul nahaja na površini delca. V primeru, da površinske molekule posedujejo reaktivna mesta, pomeni večja specifična površina tudi večjo reaktivnost. Slednjo najpogosteje povezujejo z nastankom reaktivnih kisikovih presnovkov, ki naj bi bili eden glavnih elementov citotoksičnosti nanodelcev. Reaktivni kisikovi presnovki lahko povzročijo lipidno peroksidacijo, poškodbe genskega materiala in denaturacijo proteinov. Preko aktiviranja na oksido-reduktivne spremembe občutljivih NF κ B (*angl.* nuclear factor kappa B) in MAPK (*angl.* mitogen-activated protein kinase) naj bi povzročili vnetje. Visok oksidativni stres lahko povzroči apoptozo celice.³⁹

Pomemben vidik toksičnosti NS je medsebojno delovanje s celicami imunskega sistema. Vsi odobreni NS za zdravljenje raka (Tabela 1) se dajejo intravensko. Takoj po vstopu v krvni obtok se pričnejo na njihovo površino odlagati plazemski proteini (opsonini), ki olajšajo fagocitozo v fagocitno sposobne celice imunskega sistema. Največji delež k odstranjevanju NS iz krvnega obtoka prispevajo makrofagi jetrnih celic, t.i. Kupferjeve celice. Po fagocitozi se v makrofagih sproži oksidativni izbruh, ki prispeva k nastanku reaktivnih kisikovih presnovkov in pro-vnetnih citokinov.^{40,41} NS lahko sprožijo tudi humoralni imunski odziv. Pri tem so lahko protitelesa usmerjena proti ogroditelju NS ali proti specifičnim ligandom, ki se nahajajo na njihovi površini. Slednja pomenijo večjo nevarnost, saj lahko zaradi navzkrižne reaktivnosti vežejo in onesposobijo telesu lastne biološke molekule.⁴⁰

Pomembno vlogo pri varnosti NS igra vrsta nosilca. Molekulska masa, topnost, biokompatibilnost, biorazgradljivost in očistek

so lastnosti, ki odločajo o usodi nosilca po sprostitvi učinkovine na mestu delovanja. Kadar govorimo o nebiorazgradljivih polimerih, morajo biti manjši od 40 kDa, kar je velikost, ki še omogoča izločanje skozi ledvice. V nasprotnem primeru lahko pride do kopičenja polimera v telesu. Nekateri nosilci lahko povzročijo imunsko ali alergično reakcijo, zlasti ob ponovnem dajanju zdravila.²⁴

Poglavitni problem zdravljenja z nanodelci, ki so usmerjeni proti specifičnemu antigenu ali receptorju na površini tumorskih celic, je specifičnost. Pogosto so antigeni in receptorji, proti katerim so usmerjeni ligandi na nanodelcih, prisotni tudi na normalnih in ne samo na tumorskih celicah, kar lahko povzroči neželene učinke. Tak primer je bil imunokonjugat BR96-doksorubicin, usmerjen proti antigenu Lewis-Y, ki je prisoten pri 75 % primerov raka na dojki. Imunokonjugat je na mišjem modelu *in vivo* izkazoval značilen protitumorski učinek in je imel manjšo toksičnost kot učinkovina sama. Ko so študijo ponovili na psih, je imunokonjugat povzročil akutno enteropatijo zaradi vezave na antigen Lewis-Y podobne antigene na epiteljskih celicah v prebavilih. V II. fazi klinične študije na ljudeh je BR96-doksorubicin izkazoval poleg gastrointestinalne toksičnosti le omejen protitumorski učinek, zato so klinično študijo v tej fazi ukinili.⁷

Zaključki

Vključevanje protitumorskih učinkovin v NS poveča zadrževanje učinkovine na mestu tumorja zaradi pasivnega ciljanja (učinka EPR) in aktivnega ciljanja, ki temelji na pripenjanju specifičnih ligandov na površino NS. Na ta način se zmanjša medsebojno delovanje protitumorskih učinkovin z zdravimi celicami in s tem povezani neželeni učinki. Formulacije protitumorskih učinkovin v NS imajo manj neželenih učinkov in so varnejše v primerjavi s prosto učinkovino, kar omogoča povečanje odmerka in po tem izboljšanje učinkovitosti zdravljenja. Na trgu se nahaja devet zdravil za zdravljenje raka na osnovi NS, vendar pričakujemo, da se bo to število v kratkem še povečalo.

Literatura

1. Osnovna dejstva o raku. Onkološki inštitut Ljubljana. Dosegljivo na: http://www.onko-i.si/sl/za_javnost_in_bolnike/osnovna_dejstva_o_raku/
2. Incidenca raka v Sloveniji 2005. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Register raka za Slovenijo, 2008.
3. Statistični urad Republike Slovenije, Ministrstvo za notranje zadeve–Centralni register prebivalstva, Inštitut za varovanje zdravja. Dosegljivo na: http://www.stat.si/pxweb/Database/Dem_soc/05_prebivalstvo/03_05155_nar_gib/02_05545_umrli/02_05545_umrli.asp
4. Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 2001; 411: 390–5.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
6. Pajk B. Neželeni učinki sistemskega zdravljenja raka. *Onkologija* 2007; 131–9.
7. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2007; 2: 751–60.
8. Mnenje Evropskega ekonomsko-socialnega odbora o sporočilu Komisije K evropski strategiji za nanotehnologijo 2005. Ur l EU 2005/C, 157/03.
9. National Nanotechnology Initiative, What is nanotechnology. Dosegljivo na: <http://www.nano.gov/html/facts/whatIsNano.html>.
10. Bawarski WE, Chidlowsky E, Bharali DJ, Shaker A, Mousa SA. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine* 2008; 4: 273–82.
11. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv Drug Del Rev* 2008; 60: 1615–26.
12. Obermajer N, Kos J, Kristl J. Nanodelci: sodobni dostavni sistem za učinkovine in antigene celicam imunskega sistema. *Farm Vestn* 2007; 58: 39–44.
13. Cegnar M, Kristl J, Kos J. Nanoscale polymer carriers to deliver chemotherapeutic agents to tumours. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 1557–69.
14. Williams RO, Vaughn JM. Nanoparticle Engineering. In: Swarbrick J, Boylan JC. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York: Marcel Dekker; 2000. p. 2384–98.
15. Kočevan N, Kristl J. Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi. *Farm Vestn* 2005; 56: 202–6.
16. Vicent MJ, Duncan R. Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol* 2006; 24: 39–47.
17. Duncan R. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nat Rev Cancer* 2006; 9: 688–701.
18. Lal S, Clare SE, Halas NJ. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: Impending clinical impact. *Acc Chem Res* 2008; 41: 1842–51.
19. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng* 2005; 100: 1–11.
20. Vega-Villa KR, Takemoto JK, Yáñez JA, Remsberg CM, Forrest ML, Davies NM. Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 929–38.
21. Lacerda L, Bianco A, Prato M, Kostarelos K. Carbon nanotubes: From toxicology to pharmacology. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1460–70.
22. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 1278–88.
23. Kim GJ, Nie S. Targeted cancer nanotherapy. *Nanotoday* 2005; 8: 28–33.
24. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today* 2006; 11: 812–8.
25. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83: 761–9.
26. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Abraxane®. Dosegljivo na: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/abraxane/H-778-PI-sl.pdf>.
27. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Caelyx®. Dosegljivo na: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Caelyx/H-089-PI-sl.pdf>.
28. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Myocet®. Dosegljivo na: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Myocet/H-297-PI-sl.pdf>.
29. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Neulasta®. Dosegljivo na: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/neulasta/H-420-PI-sl.pdf>.
30. Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 876–85.
31. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. *Int J Pharm* 2002; 235: 179–97.
32. Dosio F, Brusa P, Crosasso P, Arpicco S, Cattel L. Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel-albumin conjugate. *J Control Release* 1997; 47: 293–304.
33. Zhang YP, Čeh B, Lasic DD. Liposomes in Drug Delivery. In: Dumitriu S. *Polymeric Biomaterials*. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 783–818.

34. DaunoXome® official FDA information, side effects and uses. Dosegljivo na: <http://www.drugs.com/pro/daunoxome.html>.
35. Oncaspar® official FDA information, side effects and uses. Dosegljivo na: <http://www.drugs.com/pro/oncaspar.html>.
36. Ontak® official FDA information, side effects and uses. Dosegljivo na: <http://www.drugs.com/pro/ontak.html>.
37. Abe S, Otsuki M. Styrene maleic acid neocarzinostatin treatment for hepatocellular carcinoma. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002; 2:715–26.
38. Sanvicens N, Marco MP. Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol* 2008; 26: 425–33.
39. Nel A, Xia T, Mädler L, Li M. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311: 622–7.
40. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol* 2007; 2: 469–78.
41. Owens DE 3rd, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* 2006; 307: 93–102.