

**CHEMICZNE ASPEKTY CELOWANEJ TERAPII
PRZECIWNOWOTWOROWEJ
I. KOWALENCYJNE POŁĄCZENIA LIGAND-NOŚNIK**

**CHEMICAL ASPECTS OF TARGETED
ANTICANCER THERAPY
I. COVALENT BOND OF LIGAND TO CARRIER**

**Karolina M. Werengowska¹, Marek Wiśniewski¹,
Artur P. Terzyk^{1*}, Natalia Gurtowska²,
Tomasz A. Drewa²**

¹ Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Katedra Chemii Materiałów, Adsorpcji i Katalizy,
Zespół Fizykochemii Materiałów Węglowych
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

² Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Bydgoszczy, Zakład Inżynierii Tkankowej
ul. M. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz
*e-mail: aterzyk@chem.uni.torun.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Ligandy w terapii celowanej
2. Połączenia kowalencyjne
 - 2.1. Grupa amidowa
 - 2.2. Grupa tioeterowa
 - 2.3. Grupa disiarczkowa
 - 2.4. Grupa *N*-acetylohydrazonu
 - 2.5. Grupy policykliczne
 - 2.6. Grupy wprowadzane przez CC

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr Karolina M. Werengowska ukończyła studia w 2010 roku na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Od 2010 roku odbywa studia doktoranckie na Wydziale Chemii UMK. Pracę doktorską wykonuje pod kierunkiem dr hab. A.P. Terzyka, prof. UMK. Jest współautorką jednej publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz posteru prezentowanego na konferencji krajowej. Jej główne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół funkcjonalizacji nanorurek węglowych do celów biomedycznych (jako nośników leków) oraz syntezy i właściwości uporządkowanych materiałów węglowych.

dr Marek Wiśniewski ukończył studia w roku 1998 na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Pracę doktorską (2003) pt. *Filmy węglowe jako materiały modelowe w badaniach mechanizmu katalitycznej redukcji tlenku azotu(II) za pomocą amoniaku* wykonał pod kierunkiem prof. dr hab. J. Zawadzkiego (rozprawa została wyróżniona). Jest współautorem ponad trzydziestu publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz ponad czterdziestu komunikatów konferencyjnych. Jego główne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół kalorymetrii adsorpcyjnej oraz syntezy nowych materiałów węglowych.

dr hab. Artur P. Terzyk, prof. UMK ukończył studia w roku 1991 na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Pracę doktorską (1995) pt. *Kalorymetryczne badanie oddziaływań międzycząsteczkowych w układzie: adsorbat–mikroporowaty węgiel aktywny* wykonał pod kierunkiem prof. dr hab. G. Rychlickiego (rozprawa została wyróżniona). Jest stypendystą Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (1996 rok). Rozprawę habilitacyjną *Węgle aktywne – nowoczesne metody charakteryzacji oraz zastosowanie do adsorpcji substancji biologicznie czynnych* obronił (z wyróżnieniem) w roku 2005. Rozprawa została wyróżniona także nagrodą Prezesa Rady Ministrów. Jest współautorem dwóch monografii: P.A. Gauden, A.P. Terzyk, *Zarys teorii adsorpcji par gazów w mikroporach materiałów węglowych*, WIChiR, Warszawa, 2002; Artur P. Terzyk, Piotr A. Gauden i P. Kowalczyk (Eds.), *Carbon Materials Theory and Practice*, Research Signpost, 2008. Od 2008 roku pełni funkcję kierownika zespołu Fizykochemii Materiałów Węglowych. Jest członkiem komitetu naukowego konferencji ISSHAC, współautorem 160 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz 100 komunikatów konferencyjnych. Jest promotorem dwóch rozpraw doktorskich. Jego główne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół zagadnień związanych z adsorpcją z roztworów, kalorymetrią adsorpcji oraz teoretycznym opisem procesów sorpcji zachodzących na materiałach węglowych z zastosowaniem modeli analitycznych i symulacji komputerowych.

mgr Natalia Gurtowska w 2009 r. ukończyła studia magisterskie na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, kierunku – biotechnologia. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie z zakresu nauk medycznych. Rozprawę doktorską przygotowuje pod kierunkiem prof. dr hab. Gerarda Drewy. Wyniki pracy doktorantki zostały opublikowane w czasopismach naukowych mieszczących się na liście filadelfijskiej (6 publikacji) oraz zaprezentowane na kilku konferencjach naukowych w kraju i za granicą. Jest współautorem jednej monografii. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się wokół poszukiwania nowych źródeł komórek macierzystych ze szczególnym uwzględnieniem tkanki tłuszczowej otrzymywanej podczas zabiegów liposukcji.

dr hab. Tomasz Drewa, prof. UMK dyplom lekarza otrzymał w 1996 w Akademii Medycznej w Gdańsku. Od 1999 do 2009 roku pracował w Katedrze i Klinice Urologii Ogólnej, Onkologicznej i Dziecięcej CM UMK w Bydgoszczy, pod kierunkiem prof. Zbigniewa Wolskiego. Pracę doktorską z onkologii eksperymentalnej pod kierunkiem prof. Mariusza Wysockiego obronił na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Bydgoszczy, gdzie w 1999 roku otrzymał stopień naukowy doktora nauk medycznych. Dyplom specjalisty w dziedzinie urologii oraz tytuł *Fellow of the European Board of Urology* (FEBU) otrzymał w 2006, kierownikiem specjalizacji był prof. Zbigniew Wolski. W 2010 Rada Wydziału Lekarskiego CM UMK w Bydgoszczy przyznała mu tytuł doktora habilitowanego w dziedzinie medycyna – urologia, na podstawie pracy opisującej Jego dorobek naukowy, pt. *Hodowle komórek macierzystych, zróżnicowanych i ustalonych linii w wybranych chorobach układu moczowo – płciowego. Badania eksperymentalne*. Od 2010 r. pełni funkcję kierownika Zakładu Inżynierii Tkankowej CM UMK w Bydgoszczy. Od maja 2010 pracuje w Klinicznym Oddziale Urologii Onkologicznej, Centrum Onkologii w Bydgoszczy, gdzie zajmuje się nowoczesnymi technikami operacyjnymi i robotyką w urologii. Jest autorem lub współautorem ponad 240 prac naukowych. Przedstawił łącznie 37 doniesień na konferencjach międzynarodowych. Dr hab. Tomasz Drewa dwukrotnie otrzymał Nagrodę Naukową Polskiego Towarzystwa Urologicznego (2001 i 2004) oraz Nagrodę Naukową Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego (2007). Jego zainteresowania naukowe koncentrują się wokół roli enzymów lizosomalnych oraz prooksydacyjno–antyoksydacyjnych w przebiegu różnych chorób, onkologii eksperymentalnej oraz toksykologii *in vitro*, etiologii i leczenia chorób stercza, urologii rekonstrukcyjnej, regeneracji tkanek w chorobach skóry, eksperymentalnych rekonstrukcji narządów układu pokarmowego.

ABSTRACT

In this study we describe the most popular biomedical engineering nanoparticles including carbon nanotubes [17–20], liposomes [4–7], polymeric micells [11–13], quantum dots [3, 21–23], hydrogels [24–27], dendrimers [14–16] which are recently considered as modern drug carriers. These nanomaterials are applied for cancer diagnostic and targeted delivery of active compounds as chemotherapeutics in so called targeted therapy. Thus, we characterized the ideas of targeted therapy for which compositions of carriers with antibody are constructed (Figs. 3, 4). We also compared the traditional and targeted mechanisms [1, 3, 28–29] of drug delivery (Fig. 2). During targeted therapy only the essential dose of drug (less than during conventional chemotherapy) is delivering to the cancer cell. In additional, the application of targeted therapy reduces side effects, being very characteristic for the traditional treatment. The anticancer compound can selectively hits the target only, due to the presence of the ligands attached to the surface of nanocarrier. We characterized ligands which are often use in nanomedicine: antibodies [33–37], folic acid [30–33], peptides [33, 38, 39], aptamers [33, 40, 41] and transferrin [33, 42–44]. The purpose of this study is description of the bioconjugation of ligand–nanocarrier. This step is necessary and very important in synthesis of the novel drug delivery systems in targeted anticancer therapy. We report recent advances in the field showing the formation of amides (Figs. 6–8) [51–57], thioethers (Figs. 9–11) [52, 60–66], disulfides (Fig. 12) [69], and acethyl-hydrazone groups (Fig. 13) [73]. Special attention is paid to the process such as Diels–Alder (Figs. 14, 15) [74, 75] and „click chemistry” through the cycloaddition of Huisgen (Figs. 16, 17) [79–82]. We describe also the reaction of Staudinger [83] and the process of formation Schiff’s base [84]. The processes enable very mild and selective modification of the carriers through formation of amide bound. These methods ware less popular but allow the fictionalization of nanocarriers in biomedical application. Each reaction or process needs special and individual environment and conditions, which are summarized in Table 1.

Keywords: nanocarriers of drugs, targeted therapy, ligands, covalent bond, anticancer drug delivery system

Słowa kluczowe: nanonośniki leków, terapia celowana, ligandy, wiązania kowalencyjne, system dostarczania leków przeciwnowotworowych

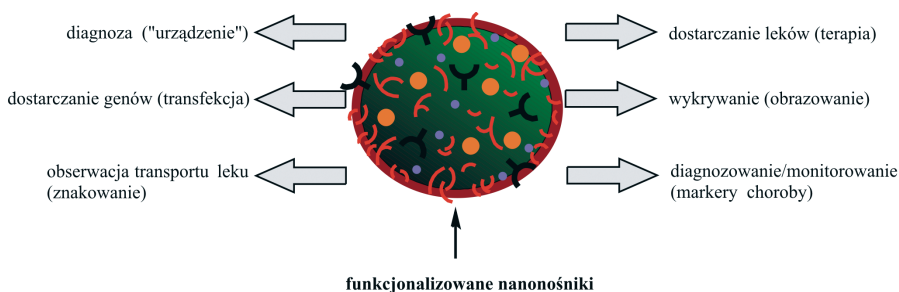
WYKAZ STOSOWANYCH SYMBOLI I OZNACZEŃ

BSA	- surowicza albumina wołowa (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
CC	- „click chemistry”
CNT	- nanorurka węglowa (ang. <i>carbon nanotube</i>)
DA	- reakcja Dielsa Aldera
DSP	- ditiobis(propioniansukcynoimidu) (ang. <i>dithiobis(succinimidylpropionate)</i>)
DSPE	- fosfatydyloetanolamina (ang. <i>phosphatidylethanolamine</i>)
DTT	- ditiotreitol (ang. <i>dithiothreitol</i>)
EDC	- 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimid (ang. <i>1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide</i>)
EGF	- czynnik wzrostu naskórka (ang. <i>epidermal growth factor</i>)
EPR	- efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (ang. <i>enhanced permeability and retention</i>)
FR	- receptor foliowy (ang. <i>folate receptor</i>)
MWCNT	- wielościenna nanorurka węglowa (ang. <i>mutli-walled carbon nanotube</i>)
NHS	- N-Hydroksysukcynoimid (ang. <i>N-hydroxysuccinimide</i>)
PAMAM	- dendrymer poliamidoaminowy (ang. <i>polyamidoamine dendrimer</i>)
PDP	- pirydylditiopropionian (ang. <i>pyridyldithiopropionate</i>)
PDP-PE	- N-[3-(2-pirydylditio)propionylo]fosfatydyloetanolamina (ang. <i>N-[3-(2-pyridyldithio)propionyl]phosphatidylethanolamine</i>)
PDP-SA	- N-[3-(pirydyltio)propionylo]-stearylamina (ang. <i>N-[3-(2-pyridylthio)propionyl]-stearylamine</i>)
PEG	- glikol polietylenowy (ang. <i>polyethylene glycol</i>)
PCL	- poli(ε-kaprolakton) (ang. <i>poly(ε-caprolactone)</i>)
P-gp	- P-glikoproteiny (ang. <i>P-glycoprotein</i>)
PPF	- poli(fumarany propylenu) (ang. <i>poly(propylene fumarate)</i>)
RGD	- tripeptydarginina-glicyna-kwasasparaginowy Arg-Gly-Asp
SATA	- N-sukcynimidowy-S-acetylotiooctan (ang. <i>N-succinimidyl-S-acetylthioacetate</i>)
SPDP	- N-sukcynimidowy-3-[2-pirydylditio]-propionian (ang. <i>N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate</i>)
SWCNT	- jednościenna nanorurka węglowa (ang. <i>single-walled carbon nanotube</i>)

TEG	- glikol tetraetylenowy (<i>ang. tetraethylene glycol</i>)
TEM	- elektronowa mikroskopia transmisyjna (<i>ang. Transmission Electron Microscopy</i>)
TF	- transeferyna (<i>ang. transferrin</i>)
QD	- kropka kwantowa (<i>ang. Quantum Dot</i>)

WPROWADZENIE

Nanotechnologia jest obecnie bardzo popularną dziedziną, mającą coraz szersze zastosowanie we współczesnej medycynie. Tzw. nanomedycyna opiera się na wykorzystaniu nanomateriałów jako potencjalnych „narzędzi” zarówno w diagnostyce medycznej jak również w dostarczaniu leków czy transferze genów (Rys. 1 [1]) [1, 2].



Rysunek 1. Zastosowanie nanomedycyny (rysunek wykonany na podstawie [1])

Figure 1. The application of nanomedicine (the figure based on [1])

Nanomedycyna ma na celu m.in. wczesne i szybkie rozpoznanie choroby oraz rozwijanie tzw. „celowanej” terapii przeciwnowotworowej [1, 2]. Terapia wydaje się być korzystna dla pacjentów, bowiem rokuje poprawą jakości życia i jego wydłużeniem [2, 3].

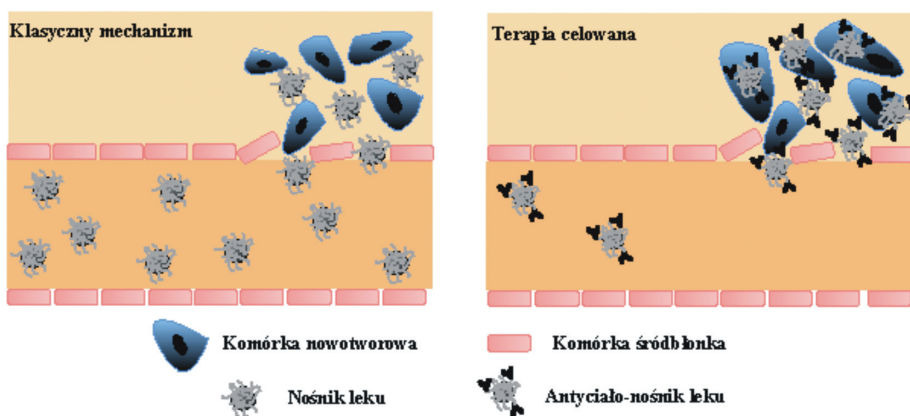
Rolę „nanonarzędzi” spełniają m.in.:

- liposomy [4–7] – odznaczają się różnorodnością strukturalną, co poszerza ich możliwości wykorzystania;
- nanocząstki [3, 8–10] – należą do grupy koloidalnych molekuł o rozmiarach submikronowych. Stosowane są nie tylko jako nośniki leków, ale także jako kontrastowe czynniki obrazowania. Główną ich zaletą jest przenikanie przez bariery biologiczne np. krew–mózg;
- micelle polimerowe [11–13] – przygotowywane są z amfifilowych kopolimerów złożonych z hydrofilowych (otoczka) i hydrofobowych (korona) bloków. Korona strukturalna składa się z komponentów umożliwiających selektywne docieranie do określonego miejsca. Cremophor EL jest pierwszą formą polimerowej miceli, uzyskaną na bazie preparatu paklitakselu;
- dendrymery [14–16] – makrocząsteczkowe związki z rozgałęzieniami dookoła wewnętrznej korony. Korzystną ich cechą jest możliwość kontrolowania kształtu i rozmiaru;
- nanorurki węglowe [17–20] – zbudowane są ze zwiniętych w cylindry poliaromatycznych warstw grafenowych. Interesująca struktura i ciekawe właściwości optyczne, mechaniczne oraz elektryczne sprawiają, iż z sukcesem znajdują zastosowanie w medycynie i biologii. Leki transportowane przy użyciu nanorurek węglowych wykazują korzystniejszy efekt terapeutyczny

w porównaniu z zastosowaniem samego farmaceutyku. Inną cechą charakterystyczną CNTs jest zdolność do absorpcji promieniowania podczerwonego, które zamienione na ciepło może być wykorzystane do niszczenia komórek nowotworowych;

- kropki kwantowe (QDs) [3, 21–23] – zaliczane są do grona fluorescencyjnych związków stosowanych w oznaczeniach medycznych. Charakteryzują się szeroką absorpcją oraz wąską emisją promieniowania w zakresie UV-Vis, przez co wykazują ciekawe właściwości optyczne wykorzystywane w morfometrii;
- hydrożele [24–27] – szeroko rozpowszechnione w zastosowaniu medycznym, szczególnie jako nośniki leków. Główne ich atuty to: biokompatybilność i biodegradowalność. Zazwyczaj tworzone są z polimerów (np. poli(fumarany propyleny) PPF) lub biomakroczyścetek (np. chitozanu, alginianu).

Celowana terapia przeciwnowotworowa musi spełniać kilka warunków. Po pierwsze, lek przeciwnowotworowy powinien być dostarczany do komórek nowotworowych przez penetrację barier układu krwionośnego, jedynie z niewielkimi stratami aktywności. Po drugie, w tkankach powinien wykazywać właściwości selektywnego zabijania komórek nowotworowych. Ponadto, uwalnianie aktywnej formy musi odbywać się w sposób kontrolowany [3]. W czasie celowanej terapii podawane są jedynie niezbędne dawki leku (mniejsze niż podczas konwencjonalnej chemioterapii), dzięki czemu minimalizowane są skutki uboczne [1, 3]. Rozprowadzane leki przenoszone są we wnętrzu bądź na powierzchni nośników (tj. nanorurek węglowych) poprzez mechanizm pasywny w konwencjonalnej chemioterapii, natomiast selektywne dostarczanie takich „nanonarzędzi” do komórki nowotworowej jest osiągnięte poprzez terapię celowaną [1] (Rys. 2 [1]).



Rysunek 2. Mechanizm dostarczania leku w terapii klasycznej i celowanej (rysunek wykonany na podstawie [1])

Figure 2. The mechanism of drug delivering in classic and targeted therapy (the figure based on [1])

Klasyczny mechanizm opiera się na zjawisku kumulacji terapeutyków (w postaci nośnik+lek) w chorych tkankach poprzez tzw. efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (*ang. enhanced permeability and retention*, EPR). EPR określa się jako zdolność do selektywnego gromadzenia oraz utrzymywania przez wydłużony czas nanozwiązków – terapeutyków w tkankach nowotworowych [28]. Wykorzystuje nieprawidłową budowę naczyń krwionośnych w okolicy guza, dzięki czemu lek z łatwością dostaje się do tkanki otaczającej komórki nowotworowe [29].

Leczenie celowane związane jest z dodatkowym przyłączeniem do terapeutyku ligandów (przeciwciał). Dzięki czemu układ przenoszenia leku wiąże się z odpowiednimi receptorami komórki nowotworowej działając selektywnie. Terapia celowana, w przeciwieństwie do systemowego leczenia konwencjonalnego, opiera się na nadekspresji receptora w komórkach nowotworowych w stosunku do zdrowych komórek, oraz powinowactwie ligandu do receptora [28]. Głównym atutem leczenia celowanego jest dostarczanie chemioterapeutyków nawet do najbardziej opornych komórek nowotworowych oraz długi czas utrzymywania się w ich wnętrzu. Dodatkowo zastosowanie takiej techniki skutkuje wysokim stężeniem leku w guzie. Kolejną zaletą to uniemożliwienie wypłukania leku do krwiobiegu. Najważniejszym wyznacznikiem określającym możliwość zastosowania danego rodzaju ligandu jest immunogenność [29]. Rozważania dotyczące najpopularniejszych przykładów związków używanych jako leków celowanych zostały przedstawione w kolejnym rozdziale.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie najważniejszych sposobów biokonjugacji, jako niezbędnego etapu produkcji nowoczesnych układów przenoszenia leków przeciwnowotworowych, na podstawie krótkiego przeglądu literaturowego.

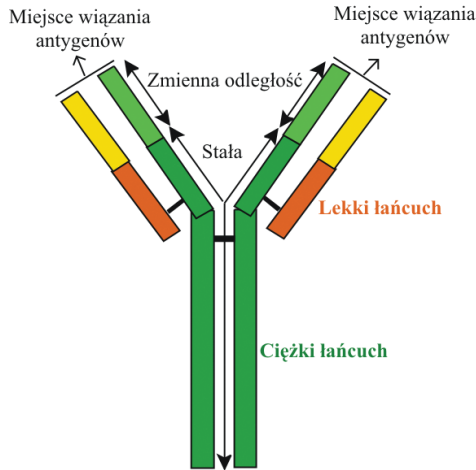
1. LIGANDY W TERAPII CELOWANEJ

Do najczęściej stosowanych ligandów w terapii celowanej zalicza się kwas foliowy i białka: aptamery, transferynę oraz przeciwciała.

Kwas foliowy charakteryzuje się niewielkim rozmiarem cząsteczkowym, ponadto jest powszechnie dostępny oraz nie wykazuje immunogenności. Wspomniane cechy umożliwiają proste łączenie tego związku z odpowiednimi nośnikami m.in. liposomami [30], nanorurkami [31, 32]. Zastosowanie kwasu foliowego jako ligandu umożliwia selektywne oddziaływanie układu przenoszenia leku z receptorem foliowym (FR) znajdującym się na powierzchni komórki nowotworowej m.in. piersi czy jajników. Bardzo często wykorzystywany jest również jako mediator w selektywnym rozprowadzaniu chemioterapeutyków [33].

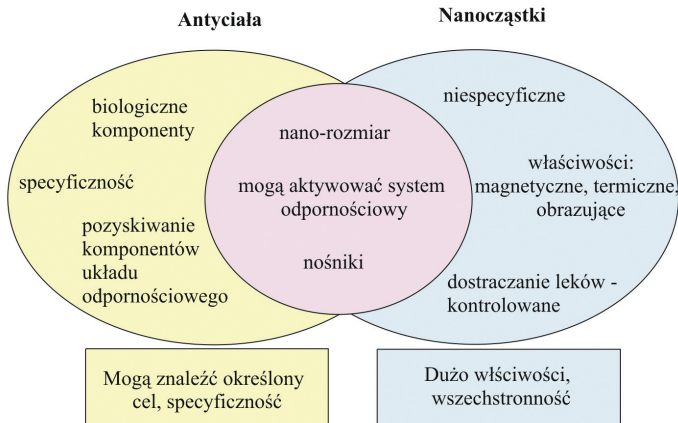
Do najbardziej popularnych przeciwciał monoklonalnych stosowanych w medycynie należą: trastuzumab, rytuksymab oraz alemtuzumab [33]. Monoklonalne przeciwciała są identyczne. Przeciwciała monoklonalne uzyskuje się w wyniku fuzji komórki nieśmiertelnej (komórki szpiczaka) z limfocytym B wytwarzającym przeciwciała o odpowiedniej swoistości, pobranym od poddanego immunizacji

zwierzęcia lub człowieka. Częsteczka przeciwciała zbudowana jest z czterech łańcuchów polipeptydowych: dwóch lekkich oraz dwóch ciężkich, połączonych wiązaniami disiarczkowymi (Rys. 3). W obydwu typach łańcuchów występują części zmienne i części stałe. Częsteczka przeciwciała zawiera dwie identyczne domeny Fab (miejsce wiążące antygen, determinujące swoistość danego przeciwciała) i Fc (odpowiedzialne za aktywację przeciwciała z receptorami komórkowymi) [34].



Rysunek 3. Schemat struktury przeciwciała (rysunek wykonany na podstawie [35])
 Figure 3. The scheme of an antibody (the figure based on [35])

Przeciwciała są szeroko stosowane w leczeniu neoadjuwantowym, gdyż są wysoce specyficzne do receptorów komórek nowotworowych. Jednakże koszt ich zastosowania jest bardzo wysoki [33]. Dodatkowo połączenie przeciwciała z nanocząsteczkami wydaje się zwiększać ich efektywność i specyficzność (Rys. 4 [34]).



Rysunek 4. Zalety połączenia przeciwciała-nanocząstka (rysunek wykonany na podstawie [34])
 Figure 4. The advantages of antibody-nanoparticle binding (the figure based on [34])

Stuart i współpracownicy [36] przedstawili przyłączenie monoklonalnego przeciwciała do powierzchni liposomu, z kolei grupa Li [37] zaproponowała wiązanie P-gp (P-glikoproteiny) do nanorurek węglowych w celu dostarczenia dokсорubicyny do komórek białaczkowych. Cytotoksyczność dokсорubicyny przenoszonej za pomocą układu dostarczania leków Ap-SWCNTs znacznie wzrosła wobec opornych wielolekowo komórek białaczki *in vitro*. Udowodniono, że przyłączenie przeciwciała do nośnika tworzy obiecujący i efektywny układ selektywnego dostarczania leków (w tym przypadku dokсорubicyny) do komórek nowotworowych.

Innymi stosowanymi w celowanej terapii ligandami są peptydy zawierające ugrupowania argininy i/lub lizyny [33]. Układ uzyskany na bazie połączenia siRNA-peptyd jest szybko wychwytywany przez odpowiednie komórki, powodując efektywne „wyciszenie” określonego genu [38]. Selektywne docieranie do guza miało także miejsce przy zastosowaniu peptydu arginina-glicyna-kwas asparaginowy (RGD) związanego z SWNTs, których powierzchnia została otoczona łańcuchami PEG (glikol polietylenowy) [39].

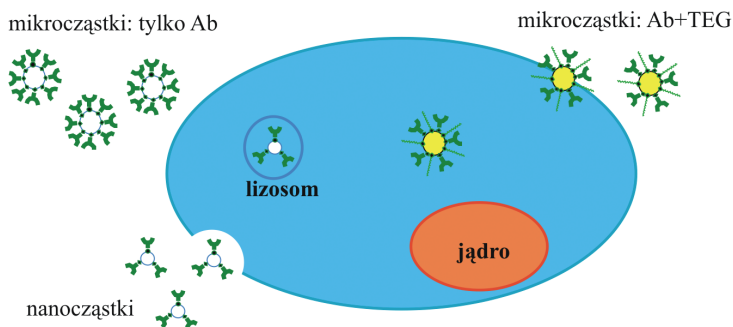
Również dekorowanie nośników aptamerami (oligonukleotydy lub peptydy odznaczające się niskim poziomem immunogenności) jest stosunkowo proste i nie wymaga dużego nakładu finansowego. Zastosowanie ich w celowanej terapii wydaje się być obiecujące [33]. Badano możliwości ich połączenia z siRNA lub z nanorurkami węglowymi [40, 41]. Van den Bossche i inni [41] zaproponowali wewnątrzkomórkowe przenoszenie biologicznie aktywnych aptamerów za pomocą wielościennych nanorurek węglowych. Połączenie takie (MWNT–Apt) daje możliwości uzyskania nowych układów dostarczania leków.

Powszechnie dostępnym białkiem jest także transferyna. Transferyna należy do glikoprotein [33]. Heidel [42] zaproponował biokonjugację nano-nośników z transferyną w terapii przeciwko mięsakowi Ewinga. Podobne rozwiązanie przedstawiła grupa Hu-Lieskovan [43], z kolei Tietze i inni [44] zastosowali transferynę chemicznie połączoną z nośnikiem polimerowym przeciwko neuroblastomii (Neuro2A).

Istnieją dwa sposoby przyłączenia ligandu do nośnika – przez oddziaływania kowalencyjne i niekowalencyjne [29]. Pierwszy typ wiązań okazuje się być bardziej efektywny, chociażby ze względu na wysoką stabilność i odtwarzalność połączeń [45] niż w przypadku zastosowania niekowalencyjnych oddziaływań (adsorpcja) [46–48]. Chemiczne połączenia są bardziej pożądane ze względu na możliwość precyzyjnej kontroli gęstości i orientacji wiązanych cząsteczek z powierzchnią nośnika [28]. Efektywność wiązania kowalencyjnego uzależniona jest od rodzaju i umiejscowienia grup funkcyjnych na powierzchni ligandu oraz ilości dostępnych miejsc do powiązania ligand–nośnik. Dodatkowo, podczas syntezy aktywność ligandu powinna zostać zachowana [45]. W związku z powyższym, główna uwaga w dalszych rozważaniach została poświęcona oddziaływaniom kowalencyjnym.

2. POŁĄCZENIA KOWALENCYJNE

Praktycznie każdy typ oddziaływań kowalencyjnych wymaga wstępnej modyfikacji powierzchni nośnika, która następnie wiąże się z cząsteczką ligandu. Tzw. bifunkcjonalizacja jest niezbędna w efektywnej, celowanej terapii przeciwnowotworowej. Dekoracja krzemionkowych mikrocząsteczek łańcuchami glikolu tetraetylenowego (TEG) i białkiem (przeciwciałem) polepsza połączenie tak uzyskanego układu z błoną komórkową oraz umożliwia migrację do komórki nowotworu złośliwego – międzybłonniaka (*mesothelioma*). Uwolniona wówczas doksorubicyna jest bardziej skuteczna w niszczeniu komórek guza niż w przypadku stosowania samego leku. W przypadku modyfikacji nośnika tylko białkiem, miałoby miejsce jedynie gromadzenie cząstek przy określonej komórce bez możliwości ich uwewnętrznienia (Rys. 5 [49]) [49].

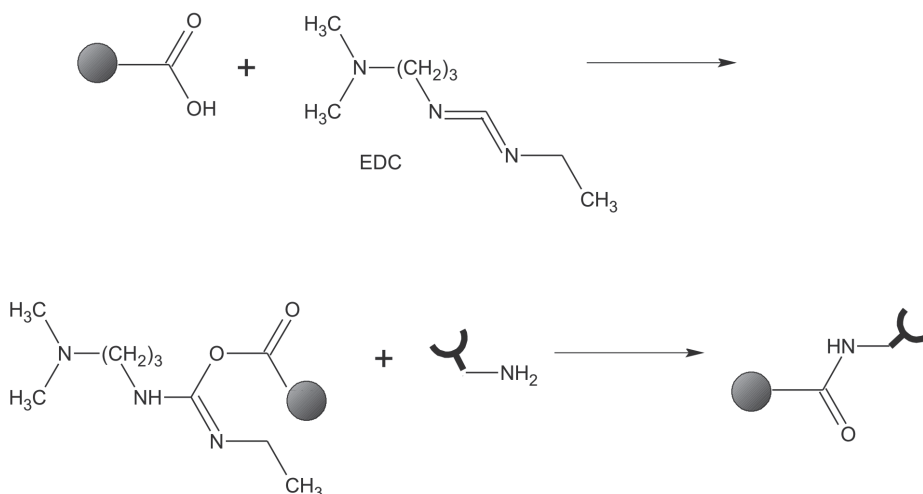


Rysunek 5. Oddziaływania modyfikowanych cząstek z komórką (rysunek wykonany na podstawie [49])
Figure 5. The interaction of modified particles with cell (the figure based on [49])

Do najbardziej popularnych i powszechnych kowalencyjnych metod zalicza się: tworzenie wiązań amidowych oraz tioeterowych [28].

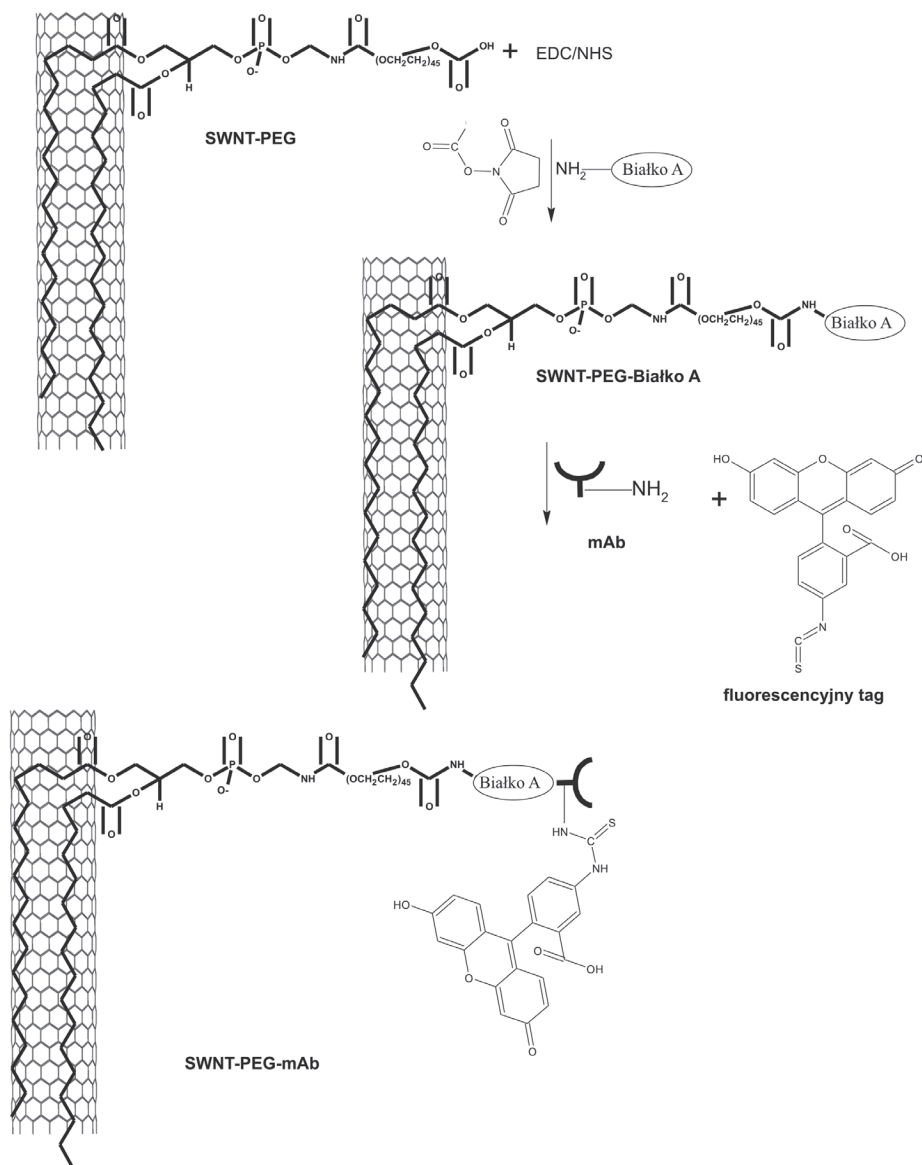
2.1. GRUPA AMIDOWA

Grupy karboksylowe znajdujące się na powierzchni nośnika aktywowane są za pomocą EDC (1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu). Reagent ten jest powszechnie stosowanym karbodiimidem zdolnym do tworzenia różnych połączeń chemicznych. Jego zaletą jest stosunkowo duża rozpuszczalność w wodzie, która umożliwia bezpośrednio zastosowanie w wodnej mieszaninie reakcyjnej bez wstępnego rozpuszczania w związkach organicznych. Takie warunki okazują się być odpowiednie dla przyłączenia cząsteczek bioaktywnych. Mechanizm działania EDC polega na reakcji związku z ugrupowaniami karboksylowymi i utworzeniu bardzo reaktywnego produktu pośredniego – acylaminoestru, który reaguje następnie z nukleofilem, czyli pierwszorzędową aminą tworząc wiązanie amidowe.



Rysunek 6. Schemat reakcji tworzenia grupy amidowej
 Figure 6. The scheme of the formation of amide group

Zasadniczą zaletą metody jest brak wstępnej modyfikacji ligandu, która mogłaby spowodować częściową utratę jego aktywności [45, 50]. Niestety w przypadku wiązania aminokwasów mogłoby dojść do aktywacji grup karboksylowych pochodzących od białka. Grupy te należy więc zablokować przed procesem np. za pomocą NHS (*N*-hydroksysukcynimidu). Grupa Ishida [51] zaproponowała przyłączenie transeferyny (TF) do liposomu dekorowanego glikolem polietylenowym (PEG). W tym celu zastosowano DSPE-PEG-COOH, który dostarczał niezbędnych ugrupowań karboksylowych. Utworzony układ TF-PEG-liposom charakteryzował się interesującymi właściwościami: długim czasem biodystrybucji oraz dużą akumulacją w guzie mózgu. Maruyama [52, 53] czy Blume [54] wraz ze współpracownikami, także opisywali tworzenie wiązań amidowych ligandów z powierzchnią liposomów otoczonych PEG-COOH. Z kolei grupa Zenga [55] opisała połączenie czynnika wzrostu naskórka (EGF) z grupą karboksylową nośnika micelnarnego. Wygenerowany układ zastosowano w celowanym dostarczaniu chemioterapeutyków. Wiązanie amidowe spotykane jest także w literaturze dotyczącej nanorurek węglowych. Ou wraz ze współpracownikami [56] zaprezentowali modyfikację SWNT glikolem polietylenowym oraz przeciwciałem mAb, które było selektywnie wychwytywane przez komórki nowotworowe zawierające receptor integryny. Schematyczny przebieg procesu biokonjugacji pokazany jest na Rysunku 7.



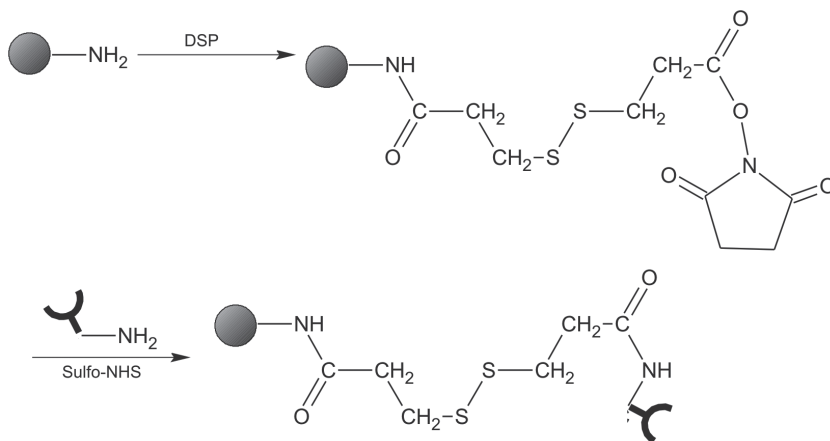
Rysunek 7. Schemat procesu syntezy SWCNT-PEG-mAb

Figure 7. The scheme of the synthesis of process SWCNT-PEG-mAb

Otrzymany układ SWCNT-PEG-mAb wykazywał wysoką dyspersję w środowisku wodnym, dużą stabilność oraz minimalną cytotoxiczność. Dodatkowo odznaczał się dużym powinowactwem do receptorów komórek nowotworowych, co znacznie zwiększyło jego wychwyty [56]. Zhang i współpracownicy [57] zmodyfikowali utlenioną powierzchnię MWCNT za pomocą biokompatybilnego dendrymeru poliamidoaminowego (PAMAM). Łańcuchy PAMAM zostały z powodzeniem przy-

łączone do nanorurek węglowych, co potwierdziły zdjęcia TEM. Powstały układ MWCNTs-PAMAM odznaczał się bardzo dobrą dyspersją i stabilnością w środowisku wodnym. Dodatkowo podjęte badania ukazały możliwość potencjalnego zastosowania w terapii genowej oraz białkowej w celu dostarczania biomolekuł [57].

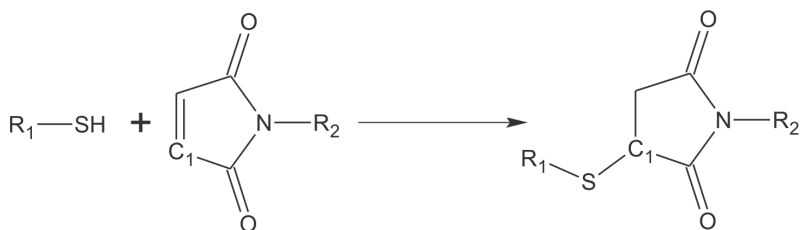
Powyższe rozważania obejmowały aktywację grupy karboksylowej znajdującej się na powierzchni nośnika. Istnieje także możliwość aktywowania pierwszorzędowej grupy aminowej nośnika, łączącej się z grupą aminową ligandu przez utworzenie pośredniego estru. Schemat takiego procesu przedstawiono na Rysunku 8 [28].



Rysunek 8. Schemat reakcji grupy aminowej nośnika z grupą aminową ligandu
Figure 8. The scheme of the reaction of carrier amine group with ligand amine group

Taki mechanizm ma miejsce przy zastosowaniu homobifunkcyjnego ditio-bis(propionianu succynimidu) (DSP). Związek ten został wykorzystany w syntezie nośnika leku zastosowanego w celowanej terapii przeciwnowotworowej raka piersi [58]. Czynniki DSP aktywowały grupę aminową polietylenoiminy. Utworzenie estru z NHS umożliwiło dalszą reakcję z monoklonalnym przeciwciałem, trastuzumabem. Metodologia okazała się bardzo skuteczna i selektywna w genowej terapii przeciwnowotworowej.

2.2. GRUPA TIOETEROWA



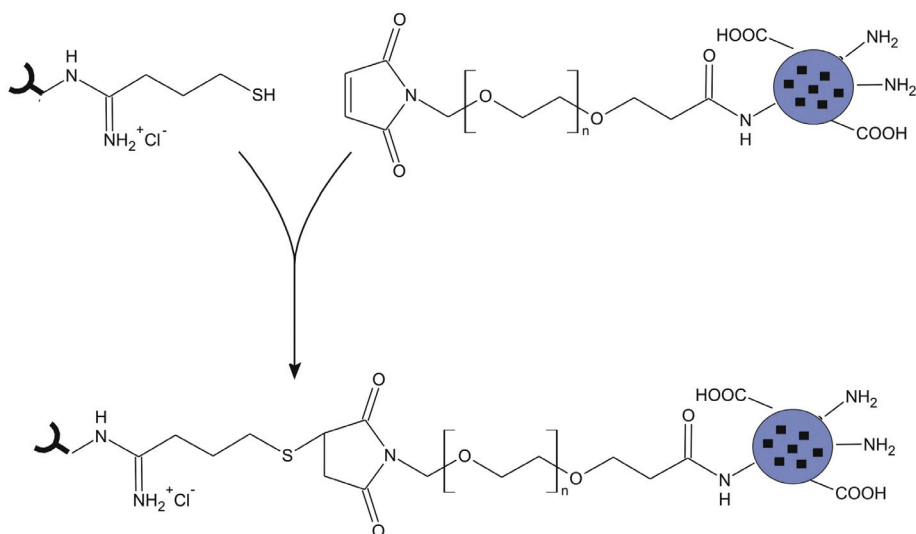
Rysunek 9. Schemat reakcji tworzenia grupy tioeterowej

Figure 9. The scheme of the formation of thioether group

Reakcja pomiędzy grupą tiolową ligandu a węglem C₁ imidu maleinowego przyłączonego do nośnika R₂ umożliwia powstanie wiązania tioeterowego, charakteryzującego się bardzo dużą trwałością [45]. Jest stabilne przez 24 h w ludzkim osoczu w obecności czynnika redukującego, np. DTT [59]. Na ogół opisana reakcja zgodna ze schematem przedstawionym na Rysunku 9 przebiega w stosunkowo krótkim czasie i łagodnych warunkach (temperatura pokojowa, środowisko wodne [28]). Niestety, reaktywność grup tiolowych bardzo szybko ulega zmniejszeniu w roztworze, co skutkuje niewystarczającą ilością tych ugrupowań, aby mogła zajść reakcja z dużą wydajnością. Wówczas dodatkowo stosowane mogą być czynniki aktywujące (np. SPDP – *N*-sukcynimidowy 3-[2-pyridylditio]-propionian oraz SATA – *N*-sukcynimidowy-*S*-acetylotiooctan), a następnie odbezpieczające reagenty redukujące (np. DTT – ditiotreitol). Niereaktywne grupy tiolowe mogą wywoływać niepożądane reakcje uboczne. Utworzenie układów tioeterowych mających zastosowanie w medycynie, z jednej strony wymaga spełnienia wielu kryteriów, zaś z drugiej, pozwala na osiągnięcie wysokiej selektywności dostarczania leków oraz dostatecznie długiego czasu ich cyrkulacji w obiegu krwi [45, 28].

Kirpotin i in. [60] wygenerowali selektywne układy przenoszenia farmaceutyków na bazie liposomu, cholesterolu oraz PEG modyfikowanego DSPE (ang. *phosphatidylethanolamine*, DSPE), do których przyłączone były przeciwciała anti-HER2 Fab z wykorzystaniem wolnych grup tiolowych. Synteza opierała się na dwóch ideach. Pierwsza z nich obejmowała sprzężenie przeciwciała blisko podwójnej warstwy liposomu. Z kolei druga, alternatywnie, polegała na wiązaniu ligandu do końcowych łańcuchów PEG. Wykazano, że możliwość wychwytu utworzonego układu anti-HER2-immunoliposom koreluje z gęstością powierzchni komórki nowotworowej oraz z efektem zahamowania wzrostu guza. Dodatkowo efektywność wzrasta wraz z ilością uwewnętrzniczonych przeciwciał Fab. Podobna metodyka, z zastosowaniem różnych przeciwciał, była stosowana z powodzeniem m.in. przez Maruyama [52], Allena [61], Hansena [62], Zalipsky'ego [63] wraz z innymi. Park i współpracownicy [64] także uzyskali immunoliposomy analogiczną metodą, efektywnie wykorzystane do dostarczania leku przeciwnowotworowego, mianowicie doksorubicyny.

Anhor wraz ze współpracownikami [65], jako pierwsi zaproponowali tioeterowe przyłączenie monoklonalnego przeciwciała, transtuzumabu, do nanocząsteczki wypełnionej cytostatycznym lekiem, dokсорubicyną. Kowalencyjne wiązanie miało miejsce pomiędzy grupą tiolową ligandu a maleinoimidową nośnika (Rys. 10 [65]). Reakcja poprzedzona była wstępną modyfikacją nośnika polegającą na kumulacji cząsteczek dokсорubicyny oraz aktywacji nanocząsteczki w wyniku zastosowania estru PEG-R-imidu maleinowego- ω -NHS. Zastosowany ligand umożliwił efektywny wychwyt układu przeciwnowotworowego przez receptor HER2 komórek raka piersi, który działał selektywnie tylko na komórki nowotworowe uwalniając w nich jedynie niezbędną dawkę leku wykazującą wydłużony czas cyrkulacji. Uzyskanie takich efektów pozwoliło na eliminację skutków ubocznych w powszechnie stosowanej chemioterapii. Nanocząsteczki okazały się bardziej efektywne niż liposomy stosowane do gromadzenia dokсорubicyny. Te pierwsze charakteryzowały się większą pojemnością, szczelnością oraz stabilnością.

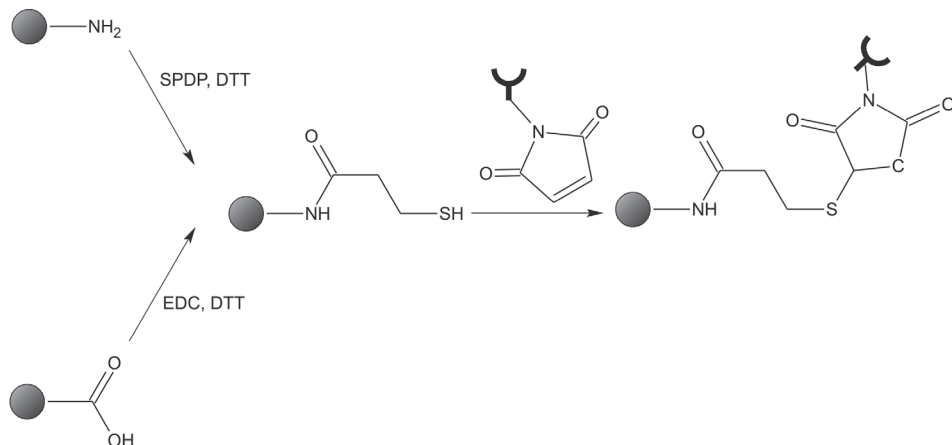


Rysunek 10. Schemat reakcji przeciwciała transtuzumabu z nanocząsteczką poprzez wiązanie tioeterowe
Figure 10. The scheme of the reaction of transtuzumab antibody with nanoparticle by thioether binding

Przyłączenie białka do nanocząstek za pomocą wiązania tioeterowego opisała grupa badawcza Gindy [66]. Nośnik (PEG-*b*-PCL ang. *poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone)*) modyfikowano imidem maleinowym, z kolei zastosowanym ligandem była albumina (BSA) zawierająca wolne ugrupowania – SH. Proces prowadzony był w środowisku wodnym. Analiza rozmiaru nośnika przed oraz po procesie potwierdziła kowalencyjne przyłączenie albuminy do jego powierzchni. Wzrost stężenia białka w roztworze podczas reakcji powodował zwiększenie ilości powstających wiązań BSA–nanocząstka.

Znane są także alternatywne sposoby syntezy, w których grupy tiolowe znajdują się na powierzchni nośnika, zaś maleinoimidowe na powierzchni ligandu. Ugrupo-

wania tiolowe mogą być wprowadzane za pomocą amin bądź grup karboksylowych, zgodnie ze schematami zamieszczonymi na Rysunku 11 [45, 28].



Rysunek 11. Schemat reakcji grup maleinoimidowych ligandu z grupami tiolowymi nośnika wprowadzonymi za pomocą amin bądź grup karboksylowych

Figure 11. The scheme of the reaction of ligand maleimide group with carrier thiol group which were initiated by amines or carboxylate groups

Metody bazujące na utworzeniu wiązań amidowych oraz tioeterowych są głównymi sposobami stosowanymi do uzyskania połączenia ligand-nośnik. Przedstawione kolejne rodzaje są pochodnymi wyżej omówionych [28].

2.3. GRUPA DISIARCZKOWA

Jednym z najszybciej oraz najłatwiej powstających połączeń na bazie dwóch grup tiolowych (pochodzących odpowiednio od nośnika i ligandu) jest wiązanie disiarczkowe (Rys. 12).



Rysunek 12. Schemat reakcji tworzenia grupy disiarczkowej

Figure 12. The scheme of the formation of disulfide group

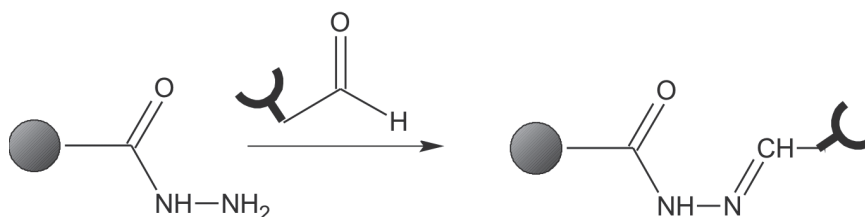
Grupy tiolowe ligandu mogą powstawać w wyniku redukcji innego wiązania disiarczkowego [67], bądź poprzez zastosowanie odpowiednich odczynników, jak SATA lub SPDP [68]. Z kolei na powierzchnię nano-nośnika wprowadzane są zazwyczaj ugrupowania PDP-PE, PDP-SA, PDP-PEG-DSPE, gdzie źródłem grup tiolowych jest PDP [28].

Jednym z przykładów powyższej reakcji jest utworzenie wiązania disiarczkowego pomiędzy liposomem monenzyny a monoklonalnym przeciwciałem anti-My9. Powierzchnia nośnika była dekorowana PDP-SA, zaś ligand modyfikowano

przy użyciu SPDP. Wprowadzone przeciwciało zachowało swój stopień immunoreaktywności. W konsekwencji uzyskany układ silnie działał na komórki linii białaczkowej (HL-60) [69].

2.4. GRUPA *N*-ACETYLOHYDRAZONU

Sprzężenie ligandu zawierającego ugrupowania hydroksylowe z nośnikiem, na którego powierzchni znajdują się ugrupowania hydrazydowe, poprzedzone jest utlenieniem w celu wytworzenia grup aldehydowych (Rys. 13) [45]. Najczęściej stosowanymi czynnikami utleniającymi są nadjodan sodu [70] oraz oksydaza galaktozy [71]. Zaletą takiej metodyki jest ścisła kontrola modyfikacji ligandu [72], jednakże okazuje się być mało wydajna [62].



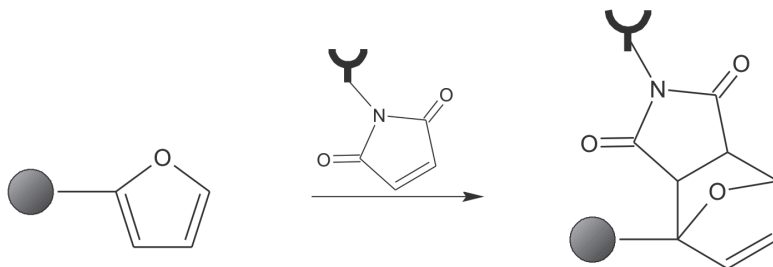
Rysunek 13. Schemat reakcji tworzenia grupy *N*-acetylohydrazonu

Figure 13. The scheme of the formation of acethyl-hydrazone group

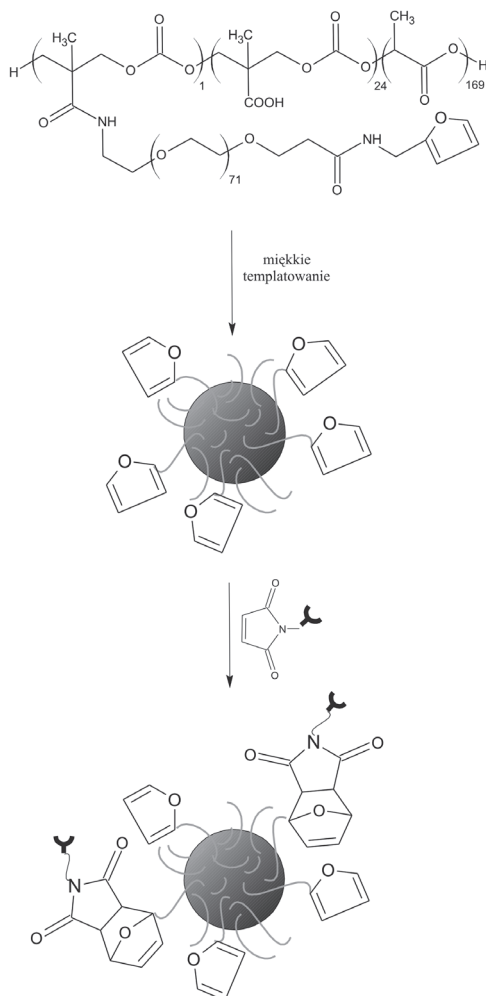
Harding i współpracownicy [73] opisali przyłączenie przeciwciała (C225) zawierającego ugrupowania aldehydowe z grupami hydrazydowymi liposomów. Badania *in vivo* pokazały, że aktywność przeciwciała w immunoliposomie została w pełni zachowana. Uzyskany układ charakteryzował się wydłużonym czasem przebywania w krwiobiegu oraz wysoką immunogennością. Szczególną zaletą wykorzystanej metodologii jest łatwa kontrola syntezy struktury immunoliposomu.

2.5. GRUPY POLICYKLICZNE

Reakcja Diesla Aldera DA (Rys. 14) polega na cykloaddycji dienu i dienofila w celu utworzenia związku bicyklicznego. Wykorzystanie tego typu połączeń podczas sprzęgania ligandów z nośnikami leków jest korzystne ze względu na wysoką wydajność reakcji oraz możliwość przeprowadzenia w stosunkowo prosty sposób i w dogodnych warunkach. Wydajność przyłączenia przeciwciała do nanonośnika za pomocą reakcji DA może sięgać nawet do 100%. Wynika to z wysokiej selektywności w pierwszym etapie. Układ ligand-nanonośnik generowany na drodze reakcji DA powoduje wywołanie specyficznych wiązań pomiędzy ligandem a komórką nowotworową [28].



Rysunek 14. Schemat reakcji tworzenia grup policyklicznych
 Figure 14. The scheme of the formation of polycyclic group



Rysunek 15. Schemat reakcji DA przeciwciała anti-HER2 z powierzchnią polimerowego nośnika
 Figure 15. The scheme of DA reaction of antibody anti-HER2 with the surface of polymeric micells

Shi i współpracownicy [74] wykorzystali reakcję DA w celu sprzężenia przeciwciała anty-HER2 z powierzchnią polimerowego nośnika, zgodnie ze schematem reakcji przedstawionym na Rysunku 15. Nośnik syntetyzowany był zgodnie z metodą „miękkiego tempaltowania”.

Grupa furanowa na zewnętrznej powierzchni nośnika spełniała rolę diena, zaś dienofilem była grupa maleimidowa przeciwciała. Obserwowano korelację efektywności techniki wraz z wydłużeniem czasu prowadzenia reakcji DA oraz ze wzrostem stosunku nanocząstka:przeciwciało. Uzyskany immunosystem zbadano pod względem skuteczności w stosunku do raka piersi [75, 76].

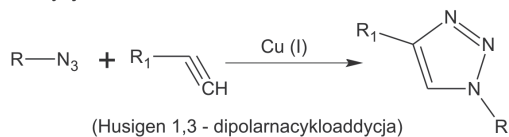
2.6. GRUPY WPROWADZANE PRZEZ CC

Termin CC (ang. *click chemistry*) został wprowadzony przez grupę badawczą Kolb [77] i obejmuje połączenia małych elementów z heteroatomem (C-X-C). Reakcje należące do grupy „click chemistry” charakteryzują się szerokim zasięgiem, wysoką wydajnością, stereospecyficznością oraz nieszkodliwymi produktami ubocznymi. Takie procesy wymagają: (i) prostych warunków ich prowadzenia, (ii) łatwo dostępnych reagentów, (iii) łagodnych i łatwych do usunięcia rozpuszczalników (np. wody).

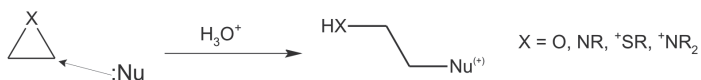
Powstający produkt powinien być stabilny w fizjologicznych warunkach oraz prosty do wyizolowania. Najczęściej stosowanymi metodami do oczyszczenia, jeśli jest to konieczne, są krystalizacja oraz destylacja [77]. W grupie reakcji „click chemistry” węgiel–heteroatom wyróżnia się cztery najważniejsze typy [77, 78] (Rys. 16):

- cykloaddycja – np. katalityczna cykloaddycja azydkowo-alkinowa Huisgena;
- substytucja nukleofilowa – np. otwieranie pierścienia heterocyklicznych elektrofilii;
- reakcje karbonylowe niealdolowego typu – np. formowanie mocznika, tiomocznika, hydrazonu;
- reakcje wiązań wielokrotnych węgiel–węgiel – np. epoksydacja, dihydroksylacja.

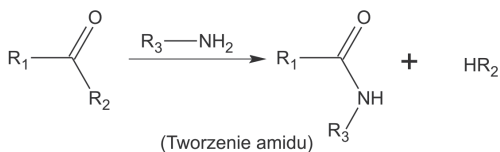
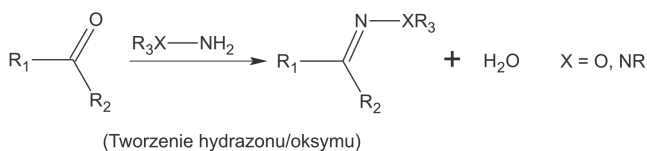
Cykloaddycja



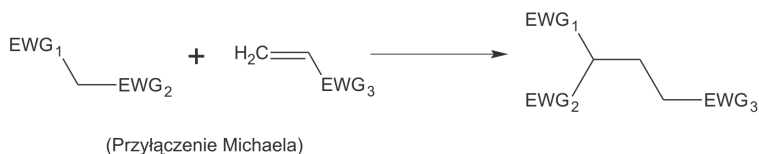
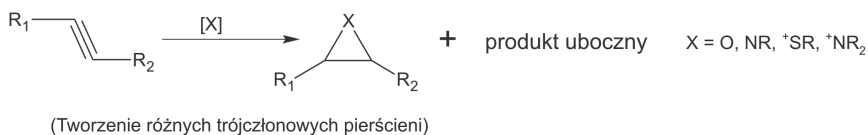
Substytucja nukleofilowa - otwieranie pierścienia



Reakcje karbonylowe niealdolowego typu



Reakcje wiązań wielokrotnych węgiel-węgiel

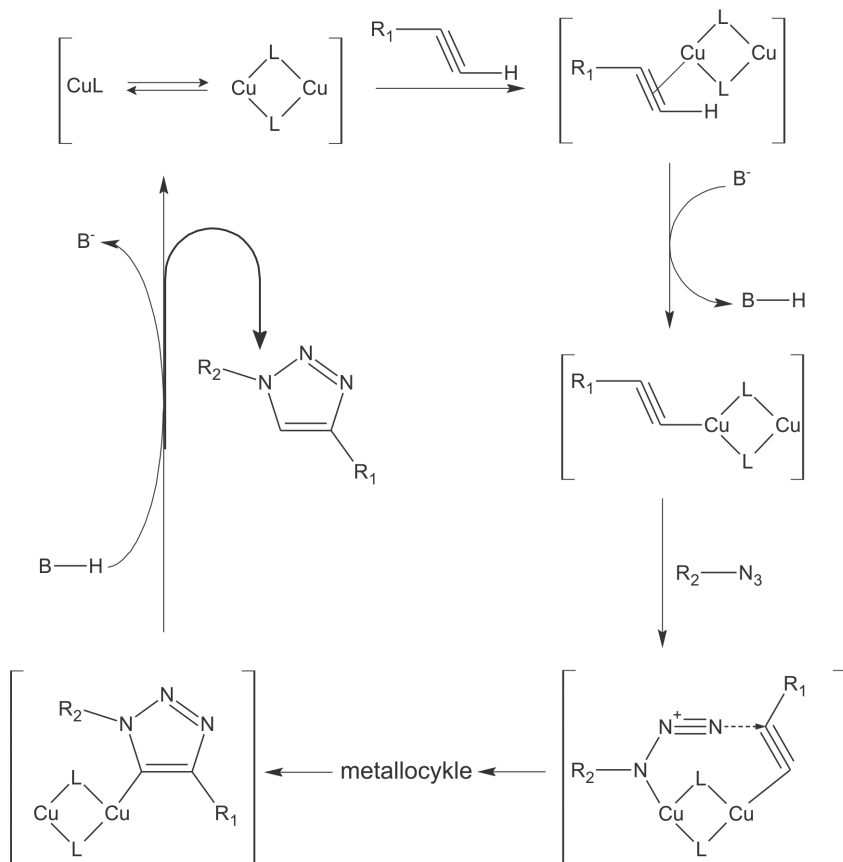


Rysunek 16. Typy reakcji „click chemistry”

Figure 16. Types of „click chemistry” reaction

Na szczególną uwagę zasługuje najpopularniejszy proces w grupie „click chemistry”, mianowicie reakcja cykloaddycji Huisgena. Polega na tworzeniu 1,2,3-triazolu w wyniku 1,3-dipolarniej cykloaddycji pomiędzy azydami a końcowymi

grupami alkilowymi w obecności katalizatora – miedzi(I) [28, 78]. Prawdopodobny mechanizm reakcji jest zgodny ze schematem na Rysunku 17 [78].



Rysunek 17. Schemat reakcji cykloaddycji Huisgena

Figure 17. The scheme of Huisgen's cycloaddition

Duża popularność reakcji związana jest z zastosowaniem łatwo dostępnych reagentów, które tolerują m.in. tlen, wodę, biologiczne molekuly oraz duży zakres skali pH, a także wykazują odporność na ekstremalne warunki. Dodatkowo charakteryzują się stabilnością w większości rozpuszczalników, w tym również organicznych [78]. Efektywne połączenie ligand–liposom na bazie cykloaddycji Huisgena przedstawił w swojej pracy Hassane wraz ze współpracownikami [79]. W roli ligandu zastosowano pochodną α -D-mannozyli z grupą azydkową, zaś liposom zawierał grupy z potrójnym wiązaniem. Badania potwierdziły niezbędny dodatek katalizatora Cu(I), w celu osiągnięcia wysokiej wydajności. Uzyskany produkt okazał się idealny, jako selektywny immunosystem [79].

Z cykloaddycją Huisgena związane są pewne ograniczenia. Zarówno zbyt duży deficyt elektronów w strukturze dienu lub zbyt duży nadmiar w strukturze dieno-

fila spowoduje, że reakcja nie zajdzie. Niekorzystnie na wydajność, a zarazem efektywność cykloaddycji Huisgena wpływa również występowanie wiązań pomiędzy alkinami, tzw. homopłączenia alkinowe, zamiast azydek–alkin. Innym problemem jest zastosowanie miedzi(I), jako katalizatora w procesie „click chemistry”, co ogranicza jego możliwości praktyczne w dziedzinie farmacji. Dostarczanie zbyt dużej dawki miedzi do organizmu ludzkiego wpływa na drastyczne pogorszenie jego kondycji [78]. Katalizowanie reakcji nośnika z białkami, kwasami nukleinowymi może skutkować mutacją bądź zmniejszeniem aktywności biocząsteczki [28]. Mimo wspomnianych ograniczeń, cykloaddycja Huisgena jest jedną z najczęściej stosowanych, korzystnych i wszechstronnych reakcji [78]. Badania De i współpracowników [80] potwierdzają możliwości wykorzystania „click chemistry” do otrzymania celowanego układu przeciwnowotworowego, poprzez przyłączenie kwasu foliowego do micelnarnej nośnika. Lu i inni [81] także dekorowali nanocząsteczki selektywnymi ligandami wykorzystując cykloaddycję Huisgena. Proces okazał się efektywny, ponieważ ok. 400 molekuł peptydów (modyfikowanych kumaryną) zostało przyłączonych do każdej nanocząstki. Analiza intensywności fluorescencyjnej kumaryny potwierdziła skuteczność reakcji pomiędzy białkiem zawierającym grupę alkinową a nonocząstką z grupą azydkową [81].

Nanorurki węglowe również poddawane są modyfikacji z wykorzystaniem cykloaddycji Huisgena. Tak sfunkcjonalizowane nośniki węglowe przebadano pod względem selektywnego dostarczania metotreksatu do komórek nowotworowych piersi [82].

Opisane powyżej typy wiązań kowalencyjnych ligand–nośnik należą do najczęściej stosowanych w praktyce. Jednakże można wyróżnić w tym zakresie jeszcze wiele innych odmian. Alternatywną i bardzo efektywną metodą funkcjonalizacji nośnika okazuje się tworzenie wiązań amidowych pomiędzy azydkami a ugrupowaniami trifosfinowymi znane jako reakcja Staudingera. Proces umożliwia chemicznie selektywną modyfikację, zazwyczaj przeprowadzany jest w temperaturze pokojowej w wodnym środowisku i nie wymaga zastosowania katalizatora.

Grupa Zhanga [83] wykorzystwała reakcję Staudingera do sprzężenia glikoliposomu z lipidem zawierającym terminalne ugrupowania trifosfinowe. Opisano syntezę pęcherzyków liposomów otoczonych ugrupowaniami trifosfinowymi łączącymi się następnie z azydkami laktozy (ligand). Zastosowane warunki reakcji nie zmieniły rozmiaru oraz struktury nośnika, a także nie zaburzyły jego funkcjonowania [83]. Metoda jest wszechstronna oraz ukierunkowana w szczególności na cząsteczki rozpuszczalne w wodzie. Może okazać się użyteczna podczas łączenia innych rodzajów ligandów do powierzchni nośnika [83].

W literaturze spotyka się także wiązanie pierwszorzędowej aminy z wolną grupą aldehydową ligandu tworzące zasadę Schiff’a [45]. Między innymi, metodyka ta została wykorzystana podczas sprzężenia transferyny (TF) z polilaktydem otoczonym łańcuchami cholesterolowymi zawierającymi na powierzchni zgromadzone cząsteczki indometacyny. Analiza badań układu TF–nośnik na komórkach nowo-

tworowych glejaka potwierdziła jego bioaktywność oraz dała szansę zastosowania jako efektywnego układu przenoszenia leków w celowanej terapii przeciwnowotworowej [84].

Najważniejsze oddziaływania kowalencyjne wraz z niezbędnymi warunkami reakcji pozwalającymi na uzyskanie wydajnego wiązania zestawia Tabela 1.

Tabela 1. Typy wiązań kowalencyjnych ligand–nośnik
Table 1. Types of covalent ligand–carrier bindings

Nazwa	Grupa funkcyjna	Grupa funkcyjna	Warunki procesu	Literatura
Grupa amidowa	Karboksyłowa	Pierwszorzędowa	EDC, NHS, pH 7,5–8,5, 2–24 h, 4 ° C l u b TP	[51–57]
Grupa tioeterowa	Maleinoimidowa	Tiolowa	pH > 7, 4–24 h, TP	[52, 60–66]
Grupa N-acetylohydrazonu	Hydrazydowa	Hydroksylowa	24 h, 5–6°C	[73]
Grupa disiarczkowa	Tiolowa	Tiolowa	pH 8,0, 2–24 h, 4°C l u b TP	[69]
Dielsa-Aldera	Furanowa	Maleinoimidowa	pH 5,5, 2–6 h, 37°C	[74, 75]
„Click chemistry” (HDC)	Azydek	Alkin	Cu(I), TP, 2–3 h	[79–82]
Staudingera	Azydek	Trifosfinowa	PBS, pH 7,4, 6 h, TP	[83]
Zasada Schiff’a	Pierwszorzędowa amina	Aldehydowa	pH 9,2, TP	[84]
Oznaczenia: TP – temperatura pokojowa				

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach znacząco wzrasta zainteresowanie związane z rozwojem nanotechnologii w medycynie. Nanomateriały okazują się być wszechstronnymi „narzędziami” zarówno do diagnostyki nowotworowej jak i do celowanego dostarczenia aktywnych związków takich jak cytostatyki. Selektywne działanie lekami za pomocą nanomateriałów umożliwia: redukcję dawki, czyli minimalizację skutków ubocznych, ochronę cząsteczki leku przed degradacją oraz polepszenie jego stabilności. Terapia celowana związana jest z modyfikacją powierzchni nośników, która ma znaczący wpływ na fizyko-chemiczne właściwości oraz efekt terapeutyczny.

Funkcjonalizacja nanonośników stosowanych w celowanej terapii stanowi różnorodną gamę reakcji chemicznych. Typ syntezy układu dostarczania leków dobierany jest w taki sposób, aby biocząsteczki zachowywały w pełni swoją aktywność. Najczęściej ligand łączy się z nośnikiem za pomocą wiązania kowalencyjnego, które

charakteryzuje się większą stabilnością niż oddziaływanie niekowalencyjne. Dodatkowo chemiczna reakcja determinowana jest przez rodzaj ligandu, a dokładnej przez umiejscowione na jego powierzchni grupy funkcyjne. Nanonośnik powinien być odpowiednio przygotowywany poprzez wprowadzenie niezbędnych ugrupowań łączących się z ligandem. Do najbardziej popularnych połączeń kowalencyjnych zalicza się wiązania amidowe oraz tioeterowe. Reakcje tworzące ugrupowania disiarczkowe lub *N*-acetylohydrazonu także stosowane są do syntezy układów dostarczania leków. Z omówionych typów wiązań największą wydajnością i stabilnością wyróżnia się oddziaływanie tioeterowe. Konwencjonalne metody zazwyczaj wymagają zastosowania reagentów organicznych, przez co powstają liczne reakcje uboczne a połączenie jest mało stabilne. Alternatywnym rozwiązaniem są procesy oparte na mechanizmach opartych na procesach Dielsa-Aldera oraz „click chemistry”, które szeroko i z powodzeniem stosowane są do dekorowania nośników biocząsteczkami [28].

Dotychczasowe wyniki badań *in vitro* oraz *in vivo* [37, 49, 65] sugerują, że opisane w niniejszej pracy nowoczesne układy dostarczania leków powinny być skuteczniejsze i efektywniejsze w stosunku do komórek nowotworowych niż tradycyjna chemioterapia. Zastosowanie więc nanomedycyny ze szczególnym uwzględnieniem aktywnego celowania wydaje się być bardzo obiecujące.

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, należy sądzić, że niezbędne są dalsze badania mające na celu opisanie metod wiązania leków z powierzchnią nanonośników, jako finalnego etapu syntezy układów dostarczania chemioterapeutyków w celowanej terapii.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] Y. Liu, H. Miyoshi, M. Nakamura, *Int. J. Cancer.*, 2007, **120**, 2527.
- [2] Y. Zhang, Y. Bai, B. Yan, *Drug Discov. Today*, 2010, **15**, 428.
- [3] R. Misra, S. Acharya, S.K. Sahoo, *Drug Discov. Today*, 2010, **15**, 842.
- [4] M.S. Mufamadi, V. Pillay, Y.E. Choonara, L.C. Du Toit, G. Modi, D. Naidoo, V.M.K. Ndesendo, *J. Drug Deliv.*, 2010, **2011**, 1.
- [5] Y. Zhang, F. Calon, C. Zhu, R.J. Boado, W.M. Pardridge, *Hum. Gene Ther.*, 2003, **14**, 1.
- [6] C.P. Leamon, S.R. Cooper, G.E. Hardee, *Bioconjug. Chem.*, 2003, **14**, 738.
- [7] M.L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel, *Int. J. Nanomed.*, 2006, **1**, 297.
- [8] S. Acharya, F.Dilnawaz, S.K. Sahoo, *Biomaterials*, 2009, **30**, 5737.
- [9] R. Misra, S.K. Sahoo, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2010, **39**, 152.
- [10] C. Mohanty, S.K. Sahoo, *Biomaterials*, 2010, **31**, 6597.
- [11] Y.S. Ahn, H.J. Baik, B.R. Lee, E.S. Lee, *Macromolecular Res.*, 2010, **18**, 747.
- [12] V.P. Torchilin, A.N. Lukyanov, Z. Gao, B. Papahadjopoulos-Sternberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 6039.
- [13] C. Mohanty, S.Acharya, A.K.Mohanty, F.Dilnawaz, S.K. Sahoo, *Nanomedicine (Lond.)*, 2010, **5**, 433.
- [14] Y. Choi, T. Thomas, A. Kotlyar, M.T. Islam, J.R. Baker, *Chem. Biol.*, 2005, **12**, 35.
- [15] H. Kobayashi, M.W. Brechbiel, *Mol. Imaging*, 2003, **2**, 1.

- [16] H. Xu, C.A. Regino, Y. Koyama, Y. Hama, A.J. Gunn, M. Bernardo, H. Kobayashi, P.L. Choyke, M.W. Brechbiel, *Bioconj. Chem.*, 2007, **18**, 1474.
- [17] A.A. Bhirde, V. Patel, J. Gavard, G. Zhang, A.A. Sousa, A. Masedunskas, R.D. Leapman, R. Weigert, J. S. Gutkind, J.F. Rusling, *ACS Nano*, 2009, **3**, 307.
- [18] B. Panchapakesan, S. Lu, K. Sivakumar, K. Tekler, G. Cesarone, E. Wickstrom, *NanoBiotechnology*; 2005, **1**, 133.
- [19] C. Shao-Yu, K. Ji-Lie, *Chinese J. Anal. Chem.*, 2009, **37**, 1240.
- [20] S. Dhar, F.X. Gu, R. Langer, O.C. Farokhzad, S.J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2008, **105**, 17356.
- [21] S. Nie, Y. Xing, G.J. Kim, J.W. Simons, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2007, **9**, 257.
- [22] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss, *Science*, 2005, **307**, 538.
- [23] C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A.M. Javier, H.E. Gaub, S. Stölzle, N. Fertig, W.J. Parak, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 331.
- [24] A. Azhdarinia, D.J. Yang, D.F. Yu, R. Mendez, C. Oh, S. Kohanim, J. Bryant, E.E. Kim, *Pharm. Res.*, 2005, **22**, 776.
- [25] R. Tan, X. Niu, S. Gan, Q. Fen, *J Mater. Sci: Mater. Med*, 2009, **20**, 1245.
- [26] Y. Liang, W. Liu, B. Han, C. Yang, Q. Ma, F. Song, Q. Bi, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2011, **82**, 1.
- [27] B. Jeong, Y.H. Bae, D.S. Lee, S.W. Kim, *Nature*, 1997, **388**, 860.
- [28] M. Shi, J. Lu, M.S. Shoichet, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 5485.
- [29] O.M. Koo, I. Rubinstein, H. Onyuksel, *Nanomedicine: Nanotechn., Biol. Med.*, 2005, **1**, 193.
- [30] W. Zhou, X. Yuan, A. Wilson, L. Yang, M. Mokotoff, B. Pitt, S. Li, *Bioconj. Chem.*, 2002, **13**, 1220.
- [31] B. Kang, D. Yu, Y. Dai, S. Chang, D. Chen, Y. Ding, *Cancer Ther.*, 2009, **5**, 1292.
- [32] X. Zhang, L. Meng, Q. Lu, Z. Fei, P.J. Dyson, *Biomaterials*, 2009, **30**, 6041.
- [33] B. Yu, X. Zhao, L.J. Lee, R.J. Lee, *The AAPS Journal*, 2009, **11**, 195.
- [34] M. Arruebo, M. Valladares and Á. González-Fernández, *J. Nanomater.*, 2009, **2009**, 1.
- [35] S. Jaracz, J. Chen, L.V. Kuznetsova, I. Ojima, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 5043.
- [36] D.D. Stuart, G.Y. Kao, T.M. Allen, *Cancer Gene Ther.*, 2000, **7**, 466.
- [37] R. Li, R. Wu, L. Zhao, M. Wu, L. Yang, H. Zou, *Am. Chem. Soc.*, 2010, **4**, 1399.
- [38] Y.L. Chiu, A. Ali, C.Y. Chu, H. Cao, T.M. Rana, *Chem. Biol.*, 2004, **11**, 1165.
- [39] Z. Liu, W. Cai, L. He, N. Nakayama, K. Chen, X. Sun, X. Chen and H. Dai, *Nat. Nanotechnol.*, 2007, **2**, 47.
- [40] J. O McNamara II, E.R. Andrechek, Y. Wang, K.D. Viles, R.E. Rempel, E. Gilboa, B.A. Sullenger & Paloma H Giangrande, *Nat. Biotechnol.*, 2006, **24**, 1005.
- [41] J. Van den Bossche, W.T. Al-Jamal, B. Tian, A. Nunes, C. Fabbro, A. Bianco, M. Pratob, K. Kostarelos, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 7379.
- [42] J.D. Heidel, Z. Yu, J. Yi-Ching Liu, S.M. Rele, Y. Liang, R.K. Zeidan, D.J. Kornbrust, M.E. Davis, *PNAS*, 2007, **104**, 5715.
- [43] S. Hu-Lieskovan, J.D. Heidel, D.W. Bartlett, M.E. Davis, T.J. Triche, *Cancer Res.*, 2005, **65**, 8984.
- [44] N. Tietze, J. Pelisek, A. Philipp, W. Roedl, T. Merdan, P. Tarcha, M. Ogris, E. Wagner, *Oligonucleotides*, 2008, **18**, 161.
- [45] L. Nobs, F. Buchegger, R. Gurny, E. Allémann, *J. Pharm. Sci.*, 2004, **93**, 1980.
- [46] J.E. Blackwell, N.M. Dagia, J.B.E.L. Dickerson, Berg, D.J. Goetz, *Ann. Biomed. Eng.*, 2001, **29**, 523.
- [47] L. Illum, P.D.E. Jones, J. Kreuter, R.W. Baldwin, S.S. Davis, *Int. J. Pharm.*, 1983, **17**, 65.

- [48] Y. Aktaş, M. Yemisci, K. Andrieux, R.N. Gürsoy, M.J. Alonso, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, E. Quiñoá, R. Riguera, M.F. Sargon, H.H. Çüelik, A.S. Demir, A.A. Hincal, T. Dalkara, Y. Çüapan, P. Couvreur, *Bioconjug. Chem.*, 2005, **16**, 1503
- [49] K. Cheng, S.R. Blumen, M.B. MacPherson, J.L. Steinbacher, B.T. Mossman, C.C. Landry, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2010, **2**, 2489.
- [50] P. Kocbek, N. Obermajer, M. Cegnar, J. Kos, J. Kristl, *J. Control. Release*, 2007, **120**, 18.
- [51] O. Ishida, K. Maruyama, H. Tanahashi, M. Iwatsuru, K. Sasaki, M. Eriguchi, H. Yanagie, *Pharm. Res.*, 2001, **18**, 1042.
- [52] K. Maruyama, T. Takizawa, T. Yuda, S.J. Kennel, L. Huang, M. Iwatsuru, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1234**, 74.
- [53] K. Maruyama, T. Takizawa, N. Takahashi, T. Tagawa, K. Nagaike, M. Iwatsuru, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1997, **24**, 235.
- [54] G. Blume, G. Cevc, M.D. Crommelin, I.A. Bakker-Woudenberg, C. Klufft, G. Storm, *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, **1149**, 180.
- [55] F. Zeng, H. Lee, C. Allen, *Bioconjug. Chem.*, 2006, **17**, 399.
- [56] Z. Ou, B. Wu, D. Xing, F. Zhou, H. Wang, Y. Tang, *Nanotechnology*, 2009, **20**, 1.
- [57] B. Zhang, Q. Chen, H. Tang, Q. Xie, M. Ma, L. Tan, Y. Zhang, S. Yao, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2010, **80**, 18.
- [58] S. Chiu, N.T. Ueno, R.J. Lee, *J. Control. Release*, 2004, **97**, 357.
- [59] F. J. Martin, D. Papahadjopoulos, *J. Biol. Chem.*, 1981, **257**, 286.
- [60] D. Kirpotin, J.W. Park, K. Hong, S. Zalipsky, W. Li, P. Carter, C.C. Benz, D. Papahadjopoulos, *Biochemistry*, 1997, **36**, 66.
- [61] T.M. Allen, E. Brandeis, C.B. Hansen, G.Y. Kao, S. Zalipsky, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1237**, 99.
- [62] C.B. Hansen, G.Y. Kao, E.H. Moase, S. Zalipsky, T.M. Allen, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1239**, 133.
- [63] S. Zalipsky, E. Brandeis, M. Newman, M.C. Woodle, *FEBS Lett.*, 1994, **353**, 71.
- [64] J.W. Park, K. Hong, P. Carter, H. Asgari, L.Y. Guo, G.A. Keller, C. Wirth, R. Shalaby, C. Kotts, W.I. Wood, D. Papahadjopoulos, C.C. Benz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 1327.
- [65] M.G. Anhorn, S. Wagner, J. Kreuter, K. Langer, H. von Briesen, *Bioconjug. Chem.*, 2008, **19**, 2321.
- [66] M.E. Gindy, S. Ji, T.R. Hoye, A.Z. Panagiotopoulos, R.K. Prud'homme, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 2705.
- [67] F.J. Martin, W.L. Hubbell, D. Papahadjopoulos, *Biochemistry*, 1981, **20**, 4229.
- [68] V.O. Ivanov, S.N. Preobrazhensky, V.P. Tsibulsky, V.R. Babaev, V.S. Repin, V.N. Smirnov, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **846**, 76.
- [69] M.S. Shaik, N. Kanikkannan, M. Singh, *J. Control. Release*, 2001, **76**, 285.
- [70] D.E. Lopes de Menezes, L.M. Pilarski, T.M. Allen, *Cancer Res.*, 1998, **58**, 3320.
- [71] M.M. Chua, S.T. Fan, F. Karush, *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **800**, 291.
- [72] S.M. Chamow, T.P. Kogan, D.H. Peers, R.C. Hastings, R.A. Byrn, A. Ashkenazi, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 15916.
- [73] J.A. Harding, C.M. Engbers, M.S. Newman, N.I. Goldstein, S. Zalipsky, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, **1327**, 181.
- [74] M. Shi, J.H. Wosnick, K. Ho, A. Keating, M.S. Shoichet, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 6126.
- [75] A. Dantas de Araffljo, J.M. Palomo, J. Cramer, M. Köhn, H. Schröder, R. Wacker, C. Niemeyer, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 296.
- [76] V. Marchán, S. Ortega, D. Pulido, E. Pedrosa, A. Grandá, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 1.
- [77] H.C. Kolb, M.G. Finn, K. Barry Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004.

-
- [78] C.D. Hein, X. Liu, D. Wang, *Pharm. Res.*, 2008, **25**, 2216.
- [79] F.S. Hassane, B. Frisch, F. Schuber, *Bioconjug. Chem.*, 2006, **17**, 849.
- [80] P. De, S.R. Gondi, B.S. Sumerlin, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 1064.
- [81] J. Lu, M. Shi, M.S. Shoichet, *Bioconjug. Chem.*, 2009, **20**, 87.
- [82] C. Samorí, H. Ali-Boucetta, R. Sainz, C. Guo, F.M. Toma, C. Fabbro, T. da Ros, M. Prato, K. Kostarelos, A. Bianco, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 1494.
- [83] H. Zhang, Y. Ma, X. Sun, *Chem. Commun.*, 2009, **751**, 269.
- [84] M. Gu, X. Yuan, C. Kang, Y. Zhao, N. Tian, P. Pu, J. Sheng, *Carbohydr. Polym.*, 2007, **67**, 417.

Praca wpłynęła do Redakcji 21 września 2011

