

**CHEMICZNE ASPEKTY CELOWANEJ TERAPII  
PRZECIWNOWOTWOROWEJ  
II. POŁĄCZENIA NOŚNIK-LEK**

**CHEMICAL ASPECTS OF TARGETED  
ANTICANCER THERAPY  
II. BOND OF CARRIER TO DRUG**

**Karolina M. Werengowska<sup>1</sup>, Marek Wiśniewski<sup>1</sup>,  
Artur P. Terzyk<sup>1\*</sup>, Natalia Gurtowska<sup>2</sup>,  
Tomasz A. Drewna<sup>2</sup>, Joanna Olkowska<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup> 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. Leki w terapii celowanej; 1.1. Paklitaksel; 1.2. Związki kompleksowe platyny;  
1.3. Doksorubicyna
2. Połączenia nanonośnik-lek; 2.1. Lek wewnątrz nanonośnika; 2.2. Lek na zew-  
nątrz nanonośnika; 2.2.1. Grupa estrowa; 2.2.2. Grupa *N*-acetylohydrazonu;  
2.2.3. Grupa amidowa; 2.2.4. Grupa disiarczkowa; 2.2.5. Adsorpcja

Podsumowanie

Wnioski

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 prof. dr hab. A.P. Terzyka. Jest współautorką dwóch publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz posterów prezentowanych na konferencjach. 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) pod tytułem *Filmy węglowe jako materiały modelowe w badaniach mechanizmu katalitycznej redukcji tlenu 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.

**Prof. dr hab. Artur P. Terzyk** ukończył studia w roku 1991 na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Pracę doktorską (1995) pod tytułem *Filmy węglowe jako materiały modelowe w badaniach mechanizmu katalitycznej redukcji tlenu azotu(II) za pomocą amoniaku* 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. Tytuł profesora zwyczajnego uzyskał w VII 2012 roku. Jest współautorem dwóch monografii: P.A. Gauden, A.P. Terzyk, *Zarys teorii adsorpcji par gazów w mikroporach materiałów węglowych*, WChIR, 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, kierunek – biotechnologia. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie z zakresu nauk medycznych. Rozprawę doktorską przygotowuje pod kierunkiem prof. dr hab. Gerarda Drey. 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 r. 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 r., 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.

**Mgr Joanna Olkowska** w 2009 r. ukończyła studia magisterskie na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, kierunek – biotechnologia, w specjalności biotechnologia medyczna. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie z zakresu nauk medycznych. Rozprawę doktorską przygotowuje pod kierunkiem dr hab. n. med. Aliny Woźniak. Wyniki pracy doktorantki zostały opublikowane w czasopismach naukowych mieszczących się na liście filadelfijskiej (5 publikacji) oraz zaprezentowane na kilku konferencjach naukowych w kraju i za granicą. Jest współautorem jednej monografii. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się na poszukiwaniu nowych źródeł komórek macierzystych ze szczególnym uwzględnieniem źródeł płodowych, głównie płynu owodniowego otrzymywanego podczas zabiegów planowej amniopunkcji od kobiet ciężarnych.

### ABSTRACT

Traditional anticancer therapy is usually low effective. Popular and common drugs applied in anticancer therapy are characterized by low solubility and nonspecific biodistribution in an organism. The chemotherapy kills not only cancer but also healthy cells [4]. Building of modern drug delivery systems based on nanocarriers is a new method of anticancer treatment. The present study is directed towards nanomaterials (as carbon nanotubes, liposomes, polymeric micelles) as modern drug carriers. Thus, we characterized mechanisms of actions of traditional chemotherapeutics: paclitaxel, cisplatin and doxorubicin (Figs. 3–5) [1, 15, 21]. The purpose of this study is a description of the bioconjugation of drug-nanocarrier. Chemotherapeutics can be connected to external or internal surfaces of nanocarriers (Fig. 6) [6]. We described two main methods of drug delivery from internal space of nanocarriers: nanoextraction and nanocondensation (Fig. 7) [32]. The type of drug-carrier bonding can be covalent or noncovalent. We report recent advances in the field showing the formation of esters (Figs. 10–11) [28, 29, 53, 54], acetylhydrazone (Fig. 12) [55–61], amides [62–64], and disulfides groups [12, 65]. These reactions depend on functional groups in structures of drugs and require suitable modification of nanocarrier surfaces. In practice, the functionalization of nanocarrier surface is associated with the covering with polymers including PEG, HPMA, PG and PLGA [3]. Adsorption is the most popular process of bonding chemotherapeutic and nanomaterials (Fig. 13) [66]. Special attention is paid to electrostatic interaction between drugs: paclitaxel [74], cisplatin [59, 76, 77], doxorubicin [67–73] and nanocarriers: carbon nanotubes and/or polymeric micells. By application of modern anticancer therapy, drugs are preserved from lysosomal degradation and to fast reaction in biological environment. Finally, nanocarriers improve adsorption of drug and increase concentration of drug only in cancer tissues [6, 7].

**Keywords:** drug nanocarriers, anticancer drugs, covalent bonds, adsorption

**Słowa kluczowe:** nanoosińiki leków, leki przeciwnowotworowe, wiązania kowalencyjne, adsorpcja

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AcOH	– kwas octowy (ang. <i>acetic acid</i> )
CNT	– nanorurka węglowa (ang. <i>carbon nanotube</i> )
DDP	– cisplatyna (ang. <i>cisplatin</i> )
DMAP	– <i>N,N</i> -dimetyloaminopirydyna (ang. <i>N,N-dimethylaminopyridine</i> )
DMF	– dimetyloformamid (ang. <i>dimethylformamide</i> )
DMSO	– dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i> )
DOX	– doksorubicyna (ang. <i>doxorubicin</i> )
EDC	– 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimid (ang. <i>1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide</i> )
EDX	– rentgenowska spektroskopia z dyspersją energii (ang. <i>Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy</i> )
EELS	– spektroskopia traconej energii elektronu (ang. <i>Electron Energy-Loss Spectroscopy</i> )
EPR	– efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (ang. <i>enhanced permeability and retention</i> )
Fmoc–Osu	– 9-fluorenylometoksykarbonyl- <i>N</i> -hydroksysukcynimidu (ang. <i>9-fluorenylmethoxycarbonyl-N-hydroxysuccinimide</i> )
FTIR	– spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
GA	– bezwodnik glutarowy (ang. <i>glutaric anhydride</i> )
GEM	– chlorowoderek gemcytabiny (ang. <i>gemcitabini hydrochloridum</i> )
HMM	– heksametylmelamina (ang. <i>hexamethylmelamine</i> )
HPMA	– kopolimer <i>N</i> -(2-hydroksypropylo)metakryloamidu (ang. <i>N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer</i> )
HR-TEM	– wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>High-Resolution Transmission Electron Microscopy</i> )
MWCNT	– wielościenna nanorurka węglowa (ang. <i>multi-walled carbon nanotube</i> )
mPEG	– metoksy-glikol polietylenowy (ang. <i>methoxy-polyethylene glycol</i> )
NHS	– <i>N</i> -hydroksysukcynimid (ang. <i>N-hydroxysuccinimide</i> )
PAGE	– poli(allil glicydylu eter) (ang. <i>poly(allyl glycidyl ether)</i> )
PAMAM	– dendrymer poliamidoaminowy (ang. <i>polyamidoamine dendrimer</i> )
PBLA	– poli( $\beta$ -benzylo- <i>L</i> -aspargian) (ang. <i>poly(<math>\beta</math>-benzyl-L-aspartate)</i> )

---

PEG	- glikol polietylenowy (ang. <i>polyethylene glycol</i> )
PG	- poli-L-kwas glutaminowy (ang. <i>poly(L-glutamic acid)</i> )
P-gp	- P-glikoproteiny (ang. <i>P-glycoprotein</i> )
PLA	- kwas polimlekowy (ang. <i>poly(lactic acid)</i> )
PLGA	- kwas poli(D,L-mlekowy-ko-glikolowy) (ang. <i>poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)</i> )
PPS	- poli(siarczek propylenu) (ang. <i>poly(propylene sulfide)</i> )
PTX	- paklitaxel (ang. <i>paclitaxel</i> )
PyBroP	- bromo-tris-pyrrolidinio-fosfoniowy heksafluorofosforan (ang. <i>bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate</i> )
SWCNT	- jednościenna nanorurka węglowa (ang. <i>single-walled carbon nanotube</i> )
XPS	- spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X (ang. <i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i> )

## WPROWADZENIE

Nowotworem określa się zaburzenia proliferacji i funkcji komórek prowadzące do nieograniczonego wzrostu tkanki objętej procesem patologicznym. Komórki nowotworowe dzielą się szybciej niż komórki prawidłowe. Stosowana terapia przeciwnowotworowa obejmuje leczenie miejscowe, które oprócz leczenia chirurgicznego wykorzystuje techniki radioterapii, zamrażania lub waporyzacji tkanki bądź systemowe polegające na podawaniu chemioterapeutyków, antybiotyków, leków działających na układ immunologiczny. Celem leczenia jest niszczenie komórek nowotworowych wrażliwych na stosowane leki [1, 2]. Tradycyjne chemioterapeutyki wprowadzane są do organizmu drogą doustną bądź dożylną. Doustne podawanie leków (w postaci tabletek) skutkować może zaburzeniem profilu farmakokinetycznego leku i w konsekwencji powodować mniejsze lub większe niż wymagane stężenie chemioterapeutyku w danej tkance lub narządzie. Skuteczność tej metody jest niska i często związana z występowaniem skutków ubocznych [3].

Powszechnie dostępne leki charakteryzują się małą efektywnością związaną m.in. z ich ograniczoną rozpuszczalnością oraz słabą i niespecyficzną biodystrybucją w tkankach. W konsekwencji niszczą nie tylko patologiczne komórki, ale także uszkodzają prawidłowe [4]. Podąża się za udoskonaleniem technik leczenia. Nowe metody obejmują obszar tzw. nanomedycyny, w ramach której proponuje się dostarczanie chemioterapeutyków za pomocą nanocząstek (np. liposomów, miceli polimerowych, nanorurek węglowych). System taki określany jest terminem: układ submikroskopijno koloidalny, który może zachowywać się jako:

- nośnik leków;
- nanosfera – matryca, gdzie lek ulega dyspersji;
- nanokapsułka – zbiornik, w którym chemioterapeutyk jest „uwięziony” w koronie hydrofobowo/hydrofilowej otoczonej membraną polimerową.

Od tego nowatorskiego sposobu dostarczania chemioterapeutyków oczekuje się przezwyciężenia licznych barier: hydrostatycznych, hydrofilowych (hydrofobowych), biofizycznych (biochemicznych) oraz oporności lekowej większości komórek nowotworowych [5].

Leki transportowane przez nanonośniki chronione są przed przedwczesną degradacją lizosomalną oraz zbyt szybką reakcją w biologicznym środowisku, co ogranicza występowanie skutków ubocznych. Charakteryzują się wydłużonym czasem cyrkulacji w układzie krwionośnym [6, 7]. Nanocząstki polepszają absorpcję chemioterapeutyku w tkance nowotworowej i jego wewnątrzkomórkową penetrację. Nanonośniki stosowane są też w celu zwiększenia miejscowego stężenia leku poprzez możliwość kontrolowania profilu farmakokinetycznego i dystrybucji chemioterapeutyku w organizmie [6].

Efektywność transportu leków za pomocą nośników bezpośrednio związana jest z rozmiarem materiału [8]. Małe rozmiary oraz mobilność nośników pozwalają na szybkie ich wnikanie do komórek nowotworowych poprzez charakterystyczne defekty naczyniowe śródbłonna (o średnicy 100–1000 nm [8]) znajdujące się

w naczyniach krwionośnych zaopatrujących nowotwór. W konsekwencji lek łatwiej dostarczany jest do komórek nowotworowych i następuje polepszenie efektu zwiększonej przepuszczalności i retencji (EPR) [9]. Rozmiar nanonośników pozwala na efektywny wychwyty systemu dostarczania leków przez różne rodzaje komórek oraz selektywną akumulację w docelowym miejscu [10]. Nowoczesny układ transportu leków przeciwnowotworowych omija istniejące w organizmie bariery naturalne, tj. barierę krew-mózg, kapilary krążenia płucnego oraz system kapilar skórnych [8]. Nanonośniki z lekiem ( $< 5 \mu\text{m}$ ), z powodzeniem mogą być podawane drogą dożylną, bowiem najmniejsze naczynia krwionośne w organizmie mają średnicę ok. 5–6  $\mu\text{m}$ . Zastosowanie takiego systemu wyklucza ryzyko powstawania zatorów [10].

Zasadnicze znaczenie odgrywa także natura chemiczna powierzchni nośników. Właściwie, hydrofobowość determinuje stopień wiązania nanocząstki ze składnikami krwi. Wymagania dotyczące minimalizacji opsonizacji oraz wydłużenia czasu cyrkulacji w obiegu krwionośnym, nanonośniki spełniają po pokryciu ich powierzchni hydrofilowym polimerem, surfaktantem lub biodegradowalnym kopolimerem, np. politlenkiem etylenu (PEG), poliksamerem czy polisorbatem 80 (Tween 80) [10].

Lek przenoszony za pomocą nanośników wychwytywany jest przez komórki, a następnie poddawany endocytozie, która może być wspomagana fagocytozą lub pinocytozą. Wówczas nie następuje efekt „szybkiego wypompowania” niewielkich cząsteczek leku z komórek w wyniku działania transbłonowej pompy lekowej (np. P-glikoproteiny), jak ma to miejsce podczas tradycyjnej terapii z użyciem niezwiązanych cząstek. Nanonośniki otaczane są przez błonę komórkową i następnie transportowane w okolice pęcherzyków endosomalnych. Dopiero wtedy ma miejsce uwalnianie chemioterapeutyku, z dala od błony komórkowej i jej pomp zależnych od ATP. Efekt ten wzmacnia oddziaływanie leku z komórką docelową [11, 12].

Szybkość uwalniania leku z nanonośnika zależy od wielu czynników, m.in. rozpuszczalności chemioterapeutyku, jego dyfuzji przez matrycę nośnika oraz możliwości erozji i degradacji systemu przenoszenia czynników przeciwnowotworowych. Zasadnicze znaczenie ma metoda włączenia leku do układu przenoszenia. Podczas gdy, między powierzchnią nanonośnika a chemioterapeutykiem powstają słabe wiązania, wówczas czynnik przeciwnowotworowy uwalniany jest stosunkowo szybko. Profil uwalniania chemioterapeutyku z systemów impregnowanych polimerem kontrolowany jest szybkością dyfuzji leku przez membranę polimerową. Dodatkowo, uwalnianie leków determinowane jest przez rozmiar nośnika. Mniejsze nanonośniki charakteryzują się dużym stosunkiem powierzchni właściwej do objętości oraz kumulacją leku bezpośrednio przy lub bardzo blisko powierzchni, co przyspiesza jego uwalnianie [10].

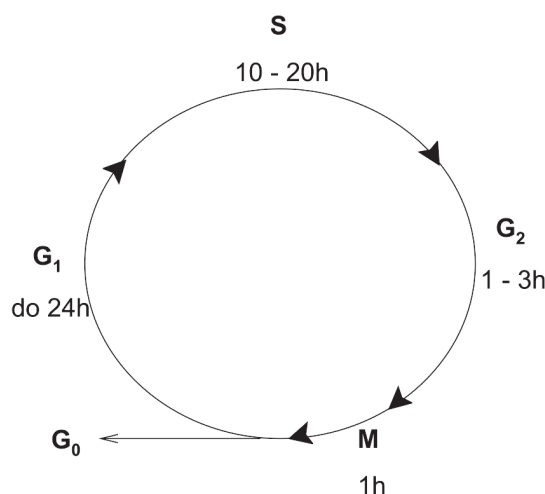
Nanonośnik usuwany jest z organizmu przez makrofagi systemu siateczkowo-śródbłonkowego, zazwyczaj nie dłużej niż w przeciągu godziny od podania leku. Dodatkowe pokrycie nanonośników rozpuszczalnymi polimerami, np. PEG wydłuża cyrkulację leku w krwi zmniejszając ich wychwyty przez makrofagi [7].



Wspomniany system z powodzeniem może zostać zastosowany w celowanej terapii przeciwnowotworowej, zgodnie z przesłankami literaturowymi przedstawionymi w pierwszej części pracy [13] poświęconej tematyce chemicznych połączeń nanoosznik-ligand. Niniejsza praca stanowi uzupełniającą część chemicznych aspektów celowanej terapii przeciwnowotworowej, opisując metody biokoniugacji leków przeciwnowotworowych do nanooszników, jako finalnego etapu syntezy układu ligand-nanoosznik-lek. Utworzony w ten sposób nowatorski system dostarczania leków przeciwnowotworowych wydaje się być najefektywniejszą metodą terapii, która pozwala na selektywny wychwyty komórek nowotworowych.

### 1. LEKI W TERAPII CELOWANEJ

Aktywność leków przeciwnowotworowych silnie związana jest z fazami cyklu komórkowego (Rys. 1 [14]). Chemioterapeutyki mogą wykazywać wzmożoną aktywność w stosunku do komórek nowotworowych bez względu na fazę cyklu życiowego (leki nieswoiste) bądź w jednej, konkretnej lub kilku fazach (leki swoiste). Komórki nowotworowe w fazie spoczynkowej ( $G_0$ ) praktycznie w ogóle nie reagują na chemioterapeutyki ze względu na fakt, iż wówczas DNA komórki nie ulega replikacji. W fazie M cyklu komórkowego ma miejsce podział komórki, zaś fazy S,  $G_1$ ,  $G_2$  składają się na interfazę, w której następuje wzrost komórki. Działanie leków przeciwnowotworowych w interfazie związane jest z ograniczeniem replikacji DNA (faza S) oraz zaburzeniami transkrypcji RNA (fazy S,  $G_1$ ,  $G_2$ ) [14].

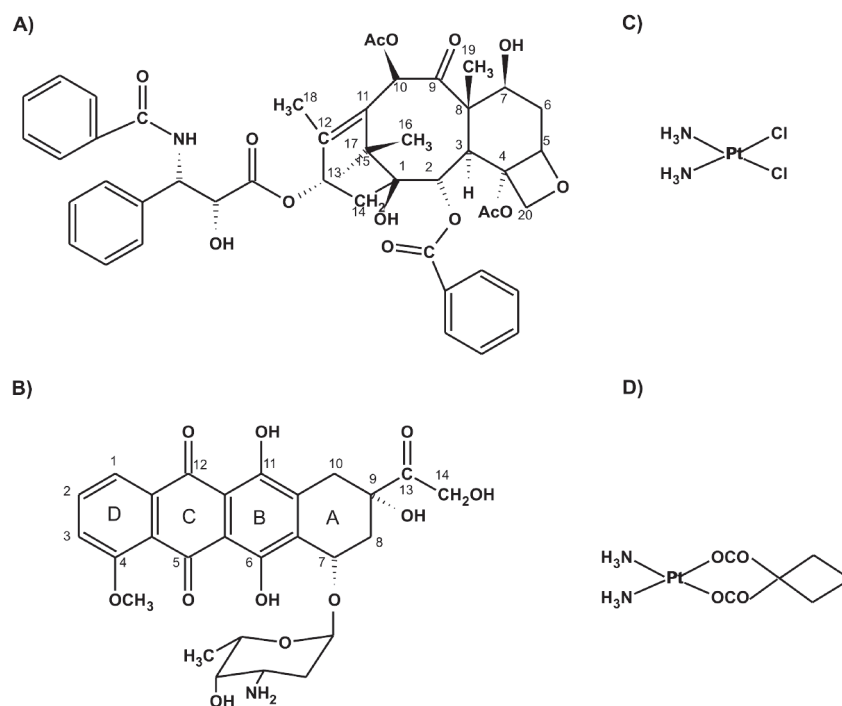


Rysunek 1. Fazy cyklu komórkowego (rysunek wykonany na podstawie [14])  
Figure 1. Cell cycle phases (the figure based on [14])

Najczęściej stosowanymi lekami w systemowym leczeniu konwencjonalnym są: doksorubicyna [15], paklitaksel [16] oraz leki syntezowane na bazie platyny [17]



(Rys. 2). Rzadziej podawane są takie chemioterapeutyki jak: metotreksat [18] czy heksametylmelamina [19].



Rysunek 2. Chemiczna struktura leków: (A) paklitaksel, (B) doksorubicyna, (C) cisplatyna, (D) karboplatyna (rysunki wykonane na podstawie [15–17])

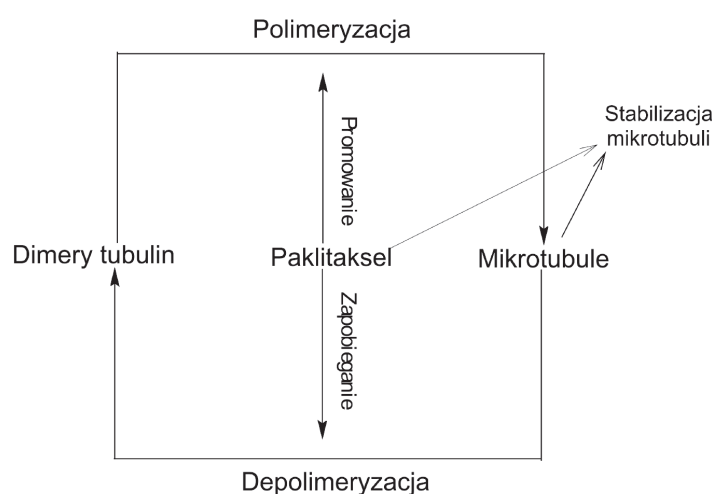
Figure 2. Drug chemical structures: (A) paclitaxel, (B) doxorubicin, (C) cisplatin, (D) carboplatin (figures based on [15–17])

### 1.1. PAKLITAKSEL

Paklitaksel należy do grupy diterpenoidów. Jego strukturalna nazwa to:  $5\beta,20$ -epoksy- $1,2\alpha,4,7\beta,10\beta,13\alpha$ -heksahydroksytax- $11$ -en- $9$ -jeden, $4,10$ -dioctan- $2$ -benzoesan  $13$ -ester z  $(2R,3S)$ - $N$ -benzoilo- $3$ -fenyloizoseryną (PTX). Paklitaksel otrzymuje się w sposób naturalny. Jest składnikiem ekstraktu z kory cisu. Związek jest wysoce lipofilowy i praktycznie nierozpuszczalny w wodzie. Głównie organiczne związki stanowią grupę rozpuszczalników paklitakselu: polioksyetylowany olej rycynowy EL (Cremophor EL), glikole polietylenowe, chloroform, aceton, etanol oraz metanol. Ze względu na fakt, iż paklitaksel wykazuje aktywność przeciwnowotworową, stosowany jest jako lek (Taxol) w postaci roztworu 50% Cremophor EL i 50% odwodnionego alkoholu. Właściwości lecznicze paklitakselu związane są z występowaniem w jego strukturze ośmioczłonowego pierścienia taksanowego, czteroczłonowego pierścienia oksetanowego oraz homochiralnego, estrowego łań-

cucha przy węglu C13. Dodatkowo, dostępna grupa hydroksylowa w pozycji 2' łańcucha estrowego polepsza aktywność terapeutyczną paklitakselu [1, 16].

Paklitaksel wpływa na polimeryzację dimerów tubulin bez konieczności hydrolizy guanozylotrifosforanu (GTP). W wyniku reakcji powstają stabilne mikrotubule przy jednoczesnym hamowaniu procesu depolimeryzacji. Paklitaksel wiąże się z  $\beta$ -podjednostką tubulin w mikrotubulach głównie przez ugrupowania taksonowe. Ostatecznie, w wyniku zaburzenia naturalnej, dynamicznej równowagi pomiędzy procesami polimeryzacji i depolimeryzacji, ma miejsce śmierć komórek związana z zahamowaniem podziałów komórkowych [1, 2, 16]. Mechanizm działania paklitakselu schematycznie przedstawia Rys. 3 [1].



Rysunek 3. Mechanizm działania paklitakselu (rysunek wykonany na podstawie [1])  
Figure 3. Mechanism of paclitaxel action (the figure based on [1])

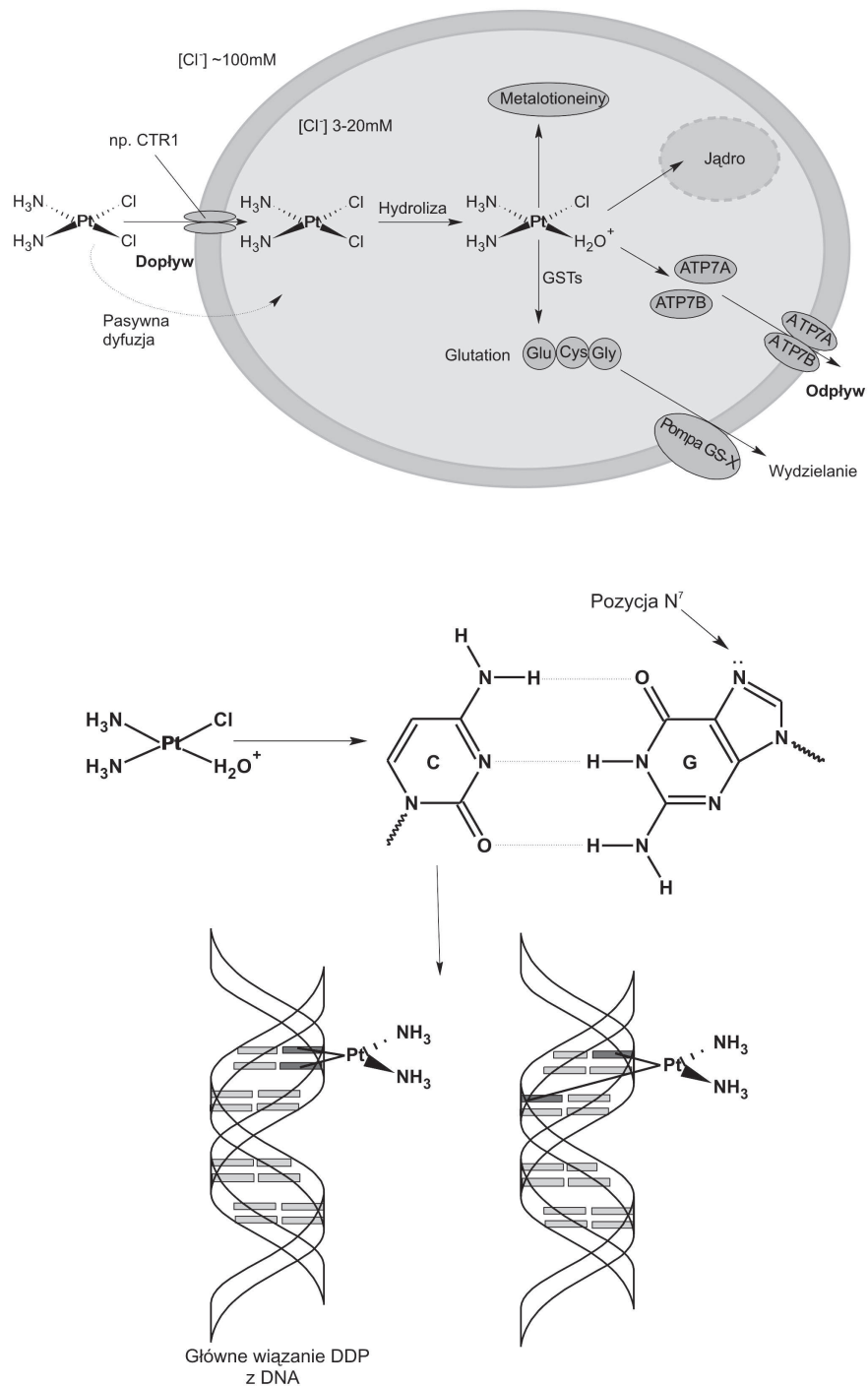
Paklitaksel zaliczany jest do leków wykazujących dwufazową aktywność, ponieważ wywołuje apoptozę komórek w fazie  $G_2$  oraz M cyklu komórkowego [1, 20] (Rys. 1). Stosowany jest w leczeniu raków piersi, jajników, płuc oraz wielu innych nowotworów. Paklitaksel indukuje skutki uboczne, między innymi neurotoksyczność czy nefrotoksyczność. Toksyczność leku związana jest ze zbyt dużą zawartością oleju rycynowego. W konsekwencji, pacjentom przyjmującym lek na bazie paklitakselu podaje się sterydy oraz redukujące przeciwhistaminy [2, 20]. Obecnie trwają badania nad udoskonaleniem terapii z wykorzystaniem paklitakselu, a przede wszystkim nad zminimalizowaniem skutków ubocznych, które jej towarzyszą. Badania skupione są na nowych metodach dostarczania leku, które jednocześnie eliminowałyby potrzebę stosowania polioksyetylowanego oleju rycynowego EL oraz zwiększałyby stabilność chemioterapeutyku w organizmie. Alternatywą okazuje się być dostarczanie paklitakselu za pomocą nanonośników (patrz tekst dalej) [1].

## 1.2. ZWIĄZKI KOMPLEKSOWE PLATYNY

Związki kompleksowe platyny stanowią obszerną i ważną grupę leków stosowanych w tradycyjnej chemioterapii. Najpopularniejsze z nich to: cisplatyna oraz karboplatyna [21]. Właściwości lecznicze omawianych związków wynikają z ich specyficznej budowy. W strukturze występują cztery ligandy, dwa z nich odznaczają się charakterem obojętnym, zaś pozostałe są aktywne i muszą znajdować się w pozycji *cis*. Pod względem budowy chemicznej związki kompleksowe platyny należą do czynników alkilujących. Leki na bazie platyny zaliczane są do grupy związków o działaniu nieswoistym. W konsekwencji ich efektywność jest niezależna od fazy rozwoju komórki nowotworowej [14].

Cisplatyna (DDP) – *cis*-diaminadichloroplatyna(II) – jako pierwsza z grupy analogów związków platyny, stosowana była i jest do tej pory w terapii przeciwnowotworowej [17]. Chemioterapeutyk jest światłoczuły i ulega dekompozycji w środowisku wodnym ze względu na zmiany położenia atomów chloru [22]. DDP najczęściej do organizmu pacjenta podawana jest drogą dożylną w postaci wodnego roztworu soli. Wprowadzana forma cisplatyny jest nieaktywna, dopiero w organizmie następuje jej uaktywnienie [24].

Właściwie, o mechanizmie działania DDP (Rys. 4 [21]) nie wiadomo jeszcze wszystkiego. Lek wykazuje swoje właściwości cytotoksyczne poprzez wiązanie się z DNA i następnie ingerowanie w naturalną transkrypcję i/lub replikację nici kwasu nukleinowego [17]. Aktywna forma DDP powstaje w organizmie pacjenta poprzez podstawienie jednego anionu chlorkowego cząsteczką wody. Proces ten jest możliwy poprzez warunki panujące w organizmie (niski poziom stężenia chlorków ok. 100 mM w komórce). Utworzone kationowe kompleksy wiążą się z DNA, a dokładniej z pozycją N7 zasady purynowej – guaniny bądź w mniejszym stopniu adeniny. Powstające wiązania poprzeczne znajdują się zarówno w obrębie jednej, jak i obu nici DNA. Takie połączenia gwarantują aktywność przeciwnowotworową leku [21]. Powodują wywijanie, zawijanie i zaginanie nici. Ograniczają wewnątrzkomórkowe procesy, jak replikację, transkrypcję oraz naprawę DNA, co w konsekwencji wywołuje zahamowanie podziałów i śmierć komórki nowotworowej [21, 25]. Właściwości cytotoksyczne wzmagane są poprzez wiązanie cisplatyny (przed wniknięciem do komórki) m.in. z fosfolipidami występującymi w błonie komórkowej [17].



Rysunek 4. Mechanizm działania DDP (rysunek wykonany na podstawie [21])  
 Figure 4. Mechanism of DDP action (the figure based on [21])

W szerokim zakresie DDP stosowana jest w leczeniu raka płuc, jajników, jąder, pęcherza moczowego oraz nerek [17]. Jednakże DDP nie jest lekiem selektywnym, przez co uszkadza także zdrowe tkanki. Toksycznie wpływa na komórki nerek, układu nerwowego i narząd słuchu. Dodatkowo powoduje problemy żołądkowe oraz niewydolność krążenia [22, 24].

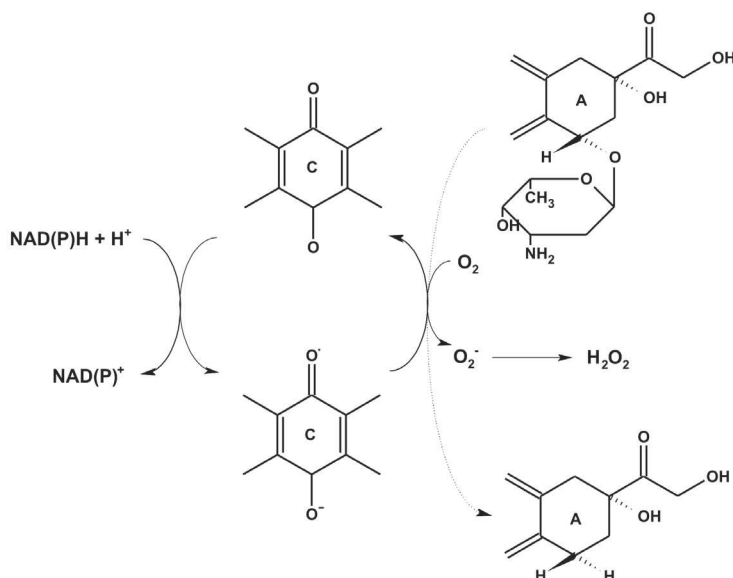
Karboplatyna (*cis*-diamina-[1,1-cyklobutandikarboksylato] platyna(II)) jest jednym z analogów cisplatyny. W swojej strukturze chemicznej zawiera ligandy tworzące pierścień chelatowy, który nadaje dużą stabilność związku. Charakteryzuje się słabym powinowactwem do białek. Karboksylanowy ligand w strukturze leku zwiększa jego rozpuszczalność w wodzie, co umożliwia łatwe przenikanie leku przez barierę krew–mózg. Chemioterapeutyk w większości usuwany jest z organizmu razem z moczem w niezmienionej postaci. Karboplatyna wykazuje mniejszą skuteczność działania niż cisplatyna w stosunku do guzów mózgu, raków głowy i szyi, przetyku oraz białaczek i chłoniaków. Z kolei efektywność leków jest zbliżona w leczeniu raka płuc czy jajników [17]. Mechanizm działania leku na DNA jest praktycznie taki sam, jak w przypadku cisplatyny. Reakcja z zastosowaniem karboplatyny jest wolniejsza (ok. 10-krotnie) i wymaga zdecydowanie większego stężenia (20–40 razy większe) [21]. Okazuje się, że karboplatyna jest lepiej tolerowana przez nerki oraz układ nerwowy niż cisplatyna. Powoduje występowanie nudności i wymiotów o mniejszym nasileniu, w konsekwencji polepsza komfort życia pacjentów. Najprawdopodobniej, mniejsza toksyczność związana jest z bardziej stabilnymi grupami opuszczającymi niż jony chlorkowe występujące w strukturze DDP [17, 21].

Oprócz karboplatyny, znanych jest więcej analogów cisplatyny o działaniu cytotoksycznym. Jednakże, cisplatyna i karboplatyna, są najczęściej wykorzystywane we współczesnej onkologii z całej gamy związków platynowych wykazujących aktywność przeciwnowotworową [17].

### 1.3. DOKSORUBICYNIA

Dokсорubicyna ((7*S*,9*S*)-7-[(2*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-4-amino-5-hydroksy-6-metylooksan-2-yl]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetyl)-4-metoksy-8,10-dihydro-7*H*-tertraceno-5,12 dion)) (DOX) zaliczana jest do grupy antybiotyków antracyklicznych. W strukturze chemicznej DOX można wyróżnić dwa główne ugrupowania: aglikonowe oraz cukrowe (tzw. daunozaminy). Ugrupowanie aglikonowe składa się z czterech pierścieni oznaczonych odpowiednio: A, B, C i D (Rys. 2). Cukier (3-amino-2,3,6-trideoksy-L-fukozyl) połączony jest z pierścieniem A wiązaniem glikozydowym [15]. Czteropierścieniowa struktura jest charakterystyczna dla rodziny związków antracyklin i powoduje ich zabarwienie w środowisku wodnym, np. DOX barwi się na czerwono. W warunkach fizjologicznych część cząsteczek leku ulega dysocjacji, zaś około połowa pozostaje neutralna. Jednakże tylko niezdisocjowane cząsteczki chemioterapeutyku wnikają do komórek w ramach dyfuzji pasywnej. Badania *in vitro* udowodniły znaczny wpływ wewnątrz- oraz zewnątrz-

komórkowego pH na wychwyt i dystrybucję antybiotyków antracyklicznych [26]. Doksorubicyna należy do grupy leków najskuteczniej i najefektywniej działających w fazie S cyklu komórkowego [14, 27]. Dodatkowo jej największa aktywność ma miejsce podczas monoterapii, czyli zaraz po zdiagnozowaniu nowotworu [27].



Rysunek 5. Jednoelektronowy cykl redoks antracyklin (rysunek wykonany na podstawie [15])  
Figure 5. One-electron redox cycling of anthracyclines (the figure based on [15])

Antracykliny, w tym DOX, są wysoce aktywnymi cząsteczkami, które wykazują duże powinowactwo do DNA. Mechanizm działania omawianej grupy leków polega na interkalacji cząsteczki leku pomiędzy sąsiadujące zasady podwójnej helisy DNA [9, 26, 27]. Związanie chemioterapeutyku powoduje odsunięcie od siebie zasad oraz lokalne skręcenie helisy DNA w kierunku odwrotnym do pierwotnego [26]. W konsekwencji następuje upośledzenie naprawy DNA, ograniczenie syntezy DNA i RNA oraz zahamowanie aktywności wielu enzymów komórkowych. Zahamowanie aktywności topolimerazy II inicjuje śmierć komórki [15, 26, 27]. Antracykliny powodują przerwanie nici DNA w wyniku powstawania wolnych rodników, generowanych podczas jednoelektronowego podstawienia do grupy chininowej („pierścień C”) (Rys. 5 [15]). Proces wspomagany jest przez oksydoreduktazy. Semirodniki redukują tlen do reaktywnej formy  $O_2^-$ , która następnie tworzy  $H_2O_2$ . Podczas cyklu następuje rozerwanie wiązania pomiędzy „pierścieniem A” a daunoaminą. Semirodniki wywołują zahamowanie aktywności enzymów oddechowych w mitochondriach i utlenianie błony lipidowej [15, 27]. W cyklu redoks DOX ma miejsce uwolnienie żelaza z zapasów wewnątrzkomórkowych. Wówczas tworzy się układ lek-żelazo, który zamienia  $O_2^-$  oraz  $H_2O_2$  w silniej działającą formę  $\cdot OH$  [15]. Tak generowane uszkodzenie błon komórkowych odgrywa zasadniczą rolę w mecha-

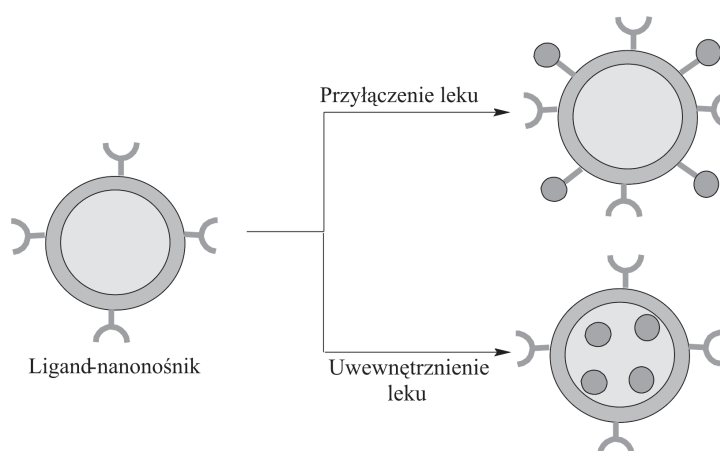
nizmie aktywności chemioterapeutyków z rodziny antracyklin w stosunku do komórek nowotworowych [15], jest jednak także przyczyną toksyczności leków z tej grupy [14].

Doksorubicyna stosowana jest najczęściej w leczeniu raka piersi, płuc, jajników, pęcherza moczowego, kości, różnych nowotworów wieku dziecięcego, mięsaków tkanek miękkich, chłoniaków oraz białaczek [15, 26]. Głównymi skutkami ubocznymi DOX są kardiotoxyczność i depresja szpiku [2].

## 2. POŁĄCZENIA NANONOŚNIK-LEK

Leki w celowanej terapii przeciwnowotworowej mogą być gromadzone zarówno na zewnątrz jak i we wnętrzu otwartych nanonośników (Rys. 6 [6]), w sposób niespecyficzny (np. adsorpcja) lub kowalencyjny [6].

Lek może zostać „włączony” do nanonośnika podczas syntezy nośnika bądź po jego uformowaniu. Gromadzenie chemioterapeutyku uzależnione jest od rozpuszczalności leku w substancji pomocniczej matrycy, masy cząsteczkowej, oddziaływań lek-nanonośnik, rodzaju występowania grup funkcyjnych na powierzchni nanonośników [10]. Materiał, z którego zbudowany jest nanonośnik powinien charakteryzować się biernością chemiczną oraz dużą czystością, co zapewni optymalne warunki kontrolowanego dostarczania leku [3].



Rysunek 6. Przyłączenie leku do powierzchni nośnika oraz umieszczenie go wewnątrz (rysunek wykonany na podstawie [6])

Figure 6. The drug conjugation to surface of a carrier and an entrapment process (the figure based on [6])

Bardzo często nanonośniki poddawane są wstępnej modyfikacji przed wprowadzeniem na ich powierzchnię chemioterapeutyków. Najpopularniejsza funkcjonalizacja obejmuje zastosowanie polimerów. Kilka naturalnych i syntetycznych polimerów strukturalnie liniowych bądź zwiniętych stosowanych jest w praktyce



medycznej, m.in.: glikol polietylenowy (PEG), kopolimer *N*-(2-hydroksypropylo)-metakryloamid (HPMA), kopolimer polistyrenu z bezwodnikiem maleinowym, poli-L-kwas glutaminowy (PG) oraz kwas poli(D,L-mlekowy-ko-glikolowy) (PLGA) [3]. Biokoniugacja leku z polimerem ma na celu poza ogólnym polepszeniem działania, wydłużenie cyrkulacji chemioterapeutyku w obiegu krwionośnym oraz jego trwałe i kontrolowane uwalnianie w ściśle określonym miejscu [7, 9, 28, 29]. Dodatkowymi atutami tego połączenia jest biodegradowalna natura polimerów, która w przypadku PLGA umożliwia degradację nanonośników do form kwasu mlekowego oraz glikolowego, które nie wykazują właściwości toksycznych dla organizmu [28]. Najpopularniejszy spośród wymienionych polimerów to PEG, który charakteryzuje się dużą rozpuszczalnością w wodzie. Zastosowanie PEG w medycynie jest bezpieczne, ze względu na jego cechy, mianowicie: biodegradowalność, minimalną toksyczność oraz kontrolowane właściwości mechaniczne [5, 7]. Polimery z jednej strony polepszają akumulację leku w określonym miejscu, jednak stwarzają barierę sferyczną pomiędzy nanonośnikiem a komórką nowotworową, co utrudnia wychwyty wewnętrzkomórkowy [9].

## 2.1. LEK WEWNĄTRZ NANONOŚNIKA

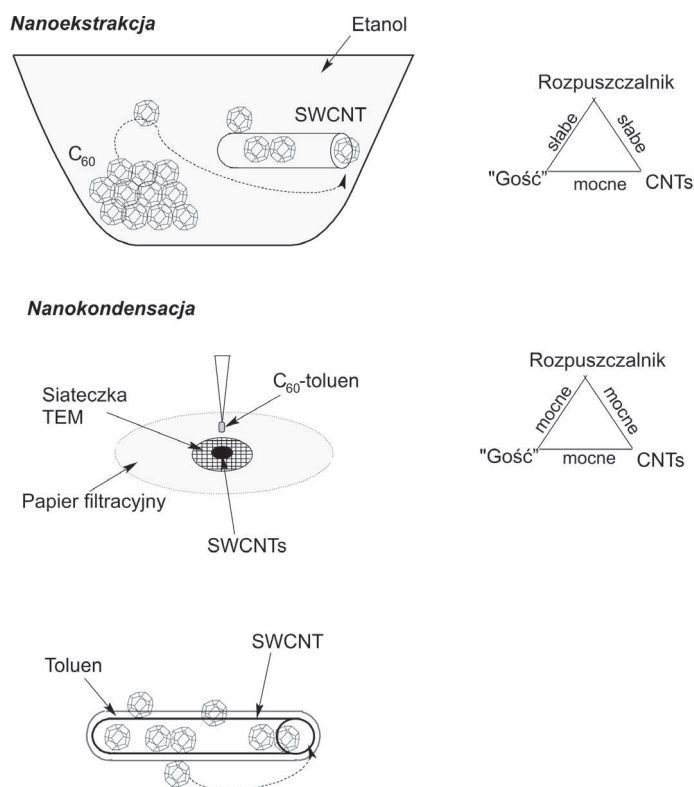
Wewnętrzne ściany nanonośników (np. CNTs) w przeciwieństwie do zewnętrznych charakteryzują się większą energią oddziaływania w stosunku do adsorbowanych molekuł (wpływ krzywizny). W związku z tym cząsteczka leku przenoszona w środku nanonośnika izolowana jest od wpływu otaczającego środowiska i jednocześnie chroniona przed przedwczesną aktywacją i procesem degradacji. Uniezwolnione jest wówczas oddziaływanie chemioterapeutyku ze zdrowymi tkankami [30, 31].

Chemioterapeutyk może zostać wprowadzony do wnętrza nanonośnika za pomocą nanoekstracji i nanokondensacji (Rys. 7 [32]). Wówczas nośnik staje się tzw. „nanokontenerem” [19, 31].

Nanoekstracja standardowo prowadzona jest z fazy ciekłej i w temperaturze pokojowej. Idea opiera się na odpowiednim doborze rozpuszczalnika względem wprowadzanej cząsteczki. „Gość” powinien wykazywać słabe powinowactwo do rozpuszczalnika oraz zdecydowanie większe do nanonośnika. Słaba rozpuszczalność wprowadzanych molekuł w rozpuszczalniku umożliwia ich „zawieszenie” w fazie ciekłej i stopniową dyfuzję do wnętrza nośnika [32].

Nanokondensacja, podobnie jak proces nanoekstracji, prowadzona jest w fazie ciekłej w temperaturze pokojowej. Jest stosunkowo prosta i szybka. W tym przypadku wprowadzane cząsteczki muszą charakteryzować się jednocześnie wysokim powinowactwem do rozpuszczalnika oraz nanonośnika. Ogólna zasada nanokondensacji polega na adsorpcji cząsteczek rozpuszczalnika na wewnętrznych i zewnętrznych ścianach nośnika. Cząsteczki „gościa” przenikają przez utworzoną,

cienką warstwę i wiążą się ze ścianą nośnika w najkorzystniejszym energetycznie miejscu poprzez oddziaływania van der Waalsa [32].



Rysunek 7. Nanoekstrakcja, nanokondensacja (rysunek wykonany na podstawie [32])  
Figure 7. Nanoextraction, nanocondensation (the figure based on [32])

W zależności od średnicy nanoosiłków, wprowadzane cząsteczki mogą układać się m.in. w pojedyncze bądź podwójne łańcuchy lub tworzyć fazę o ułożeniu zygzakowatym [32].

Metoda nanoekstrakcji została niedawno szczegółowo opisana [19]. Proces polegał na umieszczeniu leku przeciwnowotworowego – heksametylmelaminy (HMM) wewnątrz CNTs. Umieszczono także  $C_{60}$  jako zamknięcie otwartych zakończeń CNTs. Proces nanoekstrakcji poprzedzony był potraktowaniem CNTs mieszaniną kwasów ( $HNO_3$ ,  $H_2SO_4$ ). Pozwoliło to na otwarcie CNTs oraz wytworzenie ugrupowań karboksylowych, które stanowiły barierę „wejścia” dla innych cząsteczek. Autorzy udowodnili, iż tak przygotowane CNTs są odpowiednimi kandydatami do bycia nośnikami leków. Stabilna struktura CNTs oraz  $C_{60}$  chroniły lek. Dodatkowo dobór odpowiednich komponentów uszczelniających nanorurkę pozwolił na kontrolowane uwalnianie leku z jej wnętrza [19].

Tripisciano i współpracownicy [33] w swojej pracy zaprezentowali układ jednościennych nanorurek węglowych (SWCNTs) wypełnionych cisplatyną stosowany w badaniach raka prostaty. Wstępna faza przygotowywania układu obejmowała otwarcie struktury SWCNTs poprzez zastosowanie mieszaniny  $\text{HNO}_3\text{:H}_2\text{SO}_4$  (1:2). Lek wprowadzono do wnętrza przygotowanych SWCNTs metodą nanokondensacji kapilarnej. Materiał węglowy rozproszono w roztworze dimetyloformamidu (DMF) z DDP. DMF z układu po reakcji został usunięty za pomocą mieszaniny acetonu z metanolem, zaś pozostałości DDP na zewnętrznej powierzchni SWCNTs odmyto wodą. Nanorurki węglowe ograniczyły wytrącanie się leku w środowisku wodnym oraz zminimalizowały jego degradację. Obecność cisplatyny w nanorurkach węglowych potwierdziły badania, m.in. FTIR, spektroskopii Ramana, HR-TEM oraz EDX. Autorzy przeprowadzili analizy oceniające wpływ różnych stężeń „wolnego” leku oraz cisplatyny wewnątrz nanonośnika na żywotność komórek nowotworowych. Zaobserwowano wprost proporcjonalną zależność niszczenia chorych tkanek wraz ze wzrostem zawartości nośnika SWCNTs-DDP. Dodatkowo, wyższe stężenie SWCNTs-DDP wywierało tak samo silny wpływ na komórki nowotworowe jak „wolny” lek, przy czym nowatorski układ powodował mniej skutków ubocznych. W innej pracy Tripisciano i współpracownicy [34] wykorzystali także metodę nanokondensacji kapilarnej, tym razem do napełnienia wielościennych nanorurek węglowych (MWCNTs) również cisplatyną. Metodyka uwewnętrznienia chemioterapeutyku w strukturze MWCNTs była taka sama jak dla SWCNTs. Jedyna różnica polegała na zmianie czynnika oczyszczającego i otwierającego nanorurki. Mianowicie w przypadku wielościennych nanorurek węglowych zastosowano 12 M HCl. Wykorzystanie takiej samej metodyki wypełnienia materiałów węglowych charakteryzujących się odmienną ilością ścian skutkuje inną efektywnością przenoszenia cząsteczek leku, zgodnie z wynikami zamieszczonymi w Tabeli 1.

Tabela 1. Efektywność dostarczania DDP przez SWCNTs [33] oraz MWCNTs [34]  
Table 1. Effectiveness of DDP delivery by SWCNTs [33] and MWCNTs [34]

	SWCNTs	MWCNTs
Ilość leku wewnątrz CNTs	21 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ CNTs	13,6 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ CNTs
Ilość uwolnionego leku	68%	95%
Szybkość uwalniania leku	Wolniej	Szybciej
Czas, po którym nastąpiło uwolnienie maksymalnej dawki	72 h	48 h

Praktycznie cała ilość zgromadzonego leku w MWCNTs jest uwalniania, co według autorów może świadczyć o ochronie struktury chemioterapeutyku. Prawdopodobnie w systemie DDP-MWCNTs nie występują wzajemne oddziaływania, które mogą mieć miejsce dla układu DDP-SWCNTs i powodować dezaktywację leku. Wspomniane oddziaływania wynikają z obecności wewnątrz CNTs grup funkcyjnych, które powstały w wyniku traktowania SWCNTs czynnikiem utleniającym ( $\text{HNO}_3\text{:H}_2\text{SO}_4$ ) i nie zostały dostatecznie usunięte. W konsekwencji mimo większej

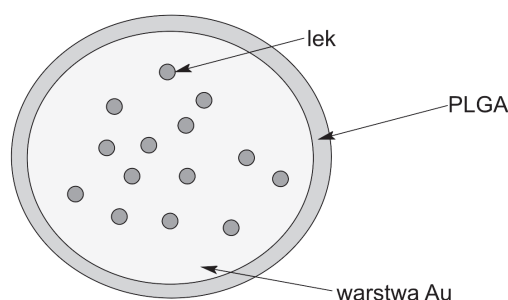
zawartości DDP zgromadzonej wewnątrz SWCNTs niż w MWCNTs, została uwolniona mniejsza ilość leku.

DDP wprowadzona została do wnętrza nanocząstki otoczonej kopolimerem przez grupę badawczą Gryparis [35]. Układ zastosowano przeciwko nowotworowi prostaty. Lek zachowywał swoją aktywność po wprowadzeniu do nośnika. Selekttywne dostarczanie DDP przez nanocząstki do komórek nowotworowych pozwoliło na uzyskanie lepszego efektu terapeutycznego w porównaniu do stosowania wodnego roztworu DDP w tradycyjnej terapii. Uzyskany system okazał się bezpieczny. Cisplatyna z powodzeniem wprowadzana jest także do innych nanoosników: miceli polimerowych [36, 37] czy liposomów [38, 39]. Badania *in vivo* oraz *in vitro* skierowano przeciwko różnym typom linii nowotworowych: chłoniaka (J6456) [38], jelita grubego (C26) [38, 39], płuc [39], żołądka (MKN 45) [37]. Prace jednoznacznie potwierdzają, że enkapsulacja DDP wewnątrz nanoosników polepsza aktywność leku i zmniejsza skutki uboczne, poprzez lokalne uwalnianie odpowiedniej dawki w chorych komórkach [36–39].

Grupa badawcza Hampela umieściła karboplatynę we wnętrzu nanorurek węglowych [40]. Po otwarciu nanoosnika lek został wprowadzony tzw. metodą „mokrą”. Wyniki uzyskane z EELS oraz XPS wskazywały na całkowite zachowanie struktury karboplatyny. Cytotoksyczność nośnika wypełnionego lekiem analizowano testem żywotności. Karboplatyna hamowała wzrost komórek nowotworowych krwi. Praca potwierdza skuteczność stosowania nanorurek węglowych, jako nanoosników chemioterapeutyków [40]. Wprowadzenie doksorubicyny do wnętrza nanocząstek o średnicy 100 nm przedstawiła grupa Mitra [41]. Dodatkowo, lek sprzężono z dekstranem, w celu zmniejszenia skutków ubocznych wywoływanych przez DOX. Układ przenoszenia leku nanocząstka–DOX uzyskano metodą odwróconej mikroemulsji. Powierzchnia systemu pokryta była polisacharydem – chitozanem, zwiększającym hydrofilowość nośnika. Autorzy [41] udowodnili nie tylko minimalizację toksycznych skutków, ale także polepszenie efektu terapeutycznego chemioterapeutyku w nanocząstce w stosunku do „wolnej” doksorubicyny. Zaobserwowano *in vivo* zmniejszenie się objętości guza po 4 tygodniach stosowania układu nanocząstka–DOX, co nie było widoczne podczas terapii z wykorzystaniem tylko leku. Dodatkowo, czas obiegu doksorubicyny w krwi oraz ilość jej akumulacji w komórce nowotworowej uległy polepszeniu.

Lince [42] oraz Park [43] także opisali proces umieszczenia doksorubicyny wewnątrz nanocząsteczek. Lince [42] opisał nanocząstki syntezowane na bazie biodegradowalnego i biokompatybilnego kopolimeru. Zastosowanie nanoosnika polimerowego wywołało polepszenie aktywności leku umieszczonego wewnątrz oraz minimalizację jego możliwych skutków ubocznych. W związku z tym zwiększył się komfort życia pacjentów poddanych tej terapii. Park [43] podobnie jak Lince [42] przedstawił umieszczenie doksorubicyny wewnątrz nanocząstki polimerowej z dodatkową warstwą złota (Rys. 8 [43]). Uzyskano interesujący układ, mianowicie DOX wewnątrz nanocząstki otoczonej PLGA i warstwą Au, łączący w sobie tra-

dycyjną chemioterapię i fototerapię. Jego skuteczność zbadano względem komórek nowotworowych szyjki macicy. Nowatorska terapia charakteryzowała się wysoką efektywnością terapeutyczną oraz stosunkowo krótkim czasem leczenia. System DOX-PLGA-Au selektywnie dostarczał nie tylko lek do komórki nowotworowej, ale także powodował wzrost temperatury, który wzmagił niszczenie chorych tkanek. Ciepło generowane było w wyniku absorpcji promieniowania NIR przez nanocząstki złota.

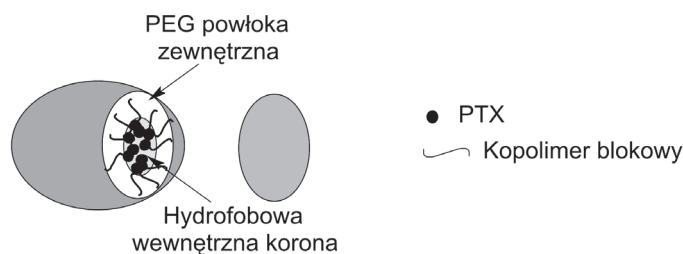


Rysunek 8. Schematyczny diagram DOX-PLGA-Au (rysunek wykonany na podstawie [43])  
Figure 8. Schematic diagram of DOX-PLGA-Au (the figure based on [43])

Dokosorubicyna w terapii przeciwnowotworowej z powodzeniem była również stosowana wewnątrz liposomów przez m.in. Matsumura [44] oraz Gabizon [45] oraz miceli przez Kataoka [46].

Paklitaksel także może zostać z powodzeniem wprowadzony do wnętrza nanośników. Koziara i inni [47] zastosowali paklitaksel wewnątrz nanocząstki w badaniach *in vitro* z użyciem dwóch linii pochodzących z guzów mózgu U-118 oraz HCT-15. Udowodniono zwiększenie aktywności cytotoksycznej chemioterapeutyku oraz ograniczenie działania transbłonowej pompy lekowej, co pozwoliło na polepszenie wychwytu leku przez komórki nowotworowe. Uzyskany system przenoszenia PXL doskonale przenikał przez barierę krew-mózg, która nastęca wiele trudności w tradycyjnej terapii. Analiza układu PXL-nanocząstka potwierdziła stabilizację struktury leku. Z kolei autorzy Ruan i Feng [48] dodatkowo udowodnili, że uwalnianie paklitakselu z nanocząstki ułatwione jest poprzez pokrycie powierzchni nanośnika kopolimerem PLA-PEG-PLA. Hydrofilowe ugrupowania PEG wewnątrz hydrofobowych segmentów PLA prawdopodobnie odpowiedzialne są za polepszenie uwolnienia chemioterapeutyku z nanocząstki [48]. Skuteczność i efektywność umieszczenia paklitakselu wewnątrz nanocząstki polimerowej potwierdził także Fonseca wraz ze współpracownikami [49].

Paklitaksel z powodzeniem przenoszony jest także wewnątrz miceli polimerowych. Grupa badawcza Hamaguchi [50] zaprezentowała nową formę PXL, mianowicie – NK105, czyli lek przenoszony w miceli (Rys. 9 [50]).



Rysunek 9. Schematyczna struktura NK105 (rysunek wykonany na podstawie [50])

Figure 9. Schematic structure of NK105 (the figure based on [50])

Wprowadzenie NK105 do organizmu odbywało się bez dodatku Cremophor EL oraz etanolu, co jest nieuniknione w tradycyjnym leczeniu. Nowa forma chemioterapeutyku wykazywała podobne kliniczne korzyści do wcześniej stosowanych. Jednakże jej zdecydowaną zaletą okazała się mniejsza toksyczność wywoływana w obwodowym układzie nerwowym oraz zdecydowanie mocniejsza aktywność polepszająca efekt EPR [50]. Podobne umieszczenie paklitakselu wewnątrz miceli polimerowej w postaci Genexol-PM zaprezentowała grupa badawcza Kima [51], która potwierdziła skuteczność nowej formy.

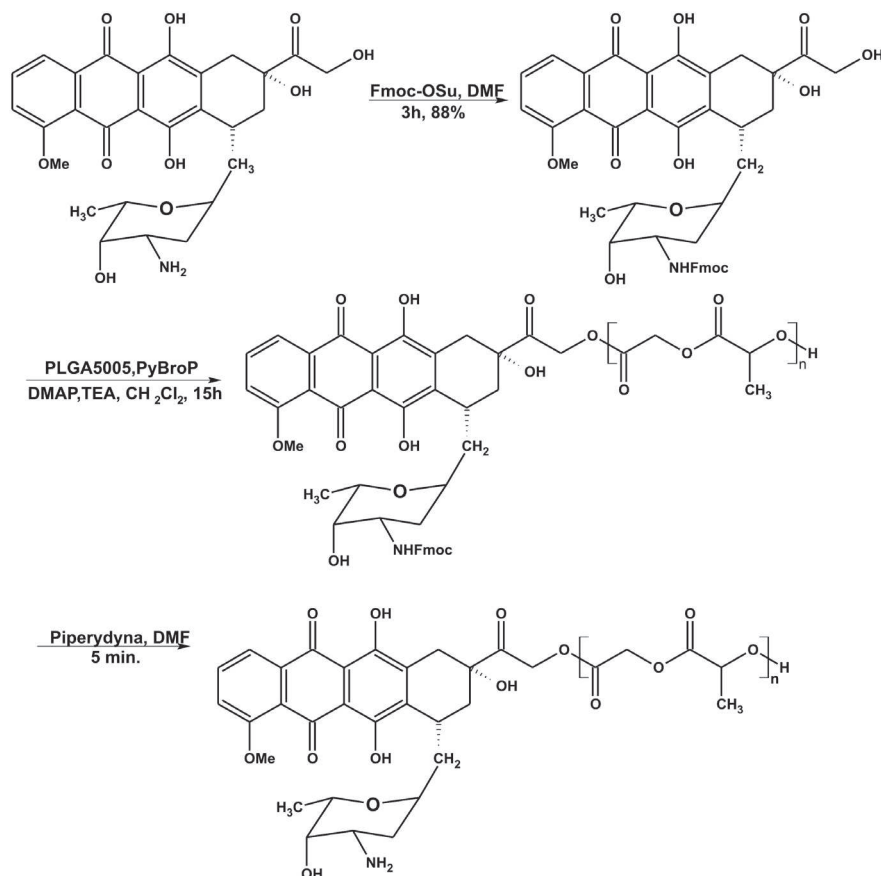
## 2.2. LEK NA ZEWNĄTRZ NANONOŚNIKA

Powszechnym sposobem dostarczania chemioterapeutyków jest chemiczne bądź fizyczne przyłączenie/gromadzenie leku na zewnętrznej powierzchni nanonośnika wykorzystujące jego właściwości chemiczne oraz dużą powierzchnię [31]. Cząsteczka leku może być sprzęgana z grupami funkcyjnymi nanonośnika lub polimerem otaczającym nanonośnik za pomocą wiązań kowalencyjnych tworzących grupy: estrowe, amidowe, *N*-acetylohydrazonu. Połączenia te powinny odznaczać się niską trwałością, pozwalającą na uwolnienie chemioterapeutyku [52]. Dodatkowo wiązanie nośnik–lek powinno charakteryzować się wrażliwością na pH, którego wartość musi być nieznacznie większa (o 0,5–1 jednostkę) niż pH panujące w przeciętnych tkankach i krwi [12]. Leki o strukturze płaskiej i aromatycznej mogą być także adsorbowane na odpowiednio przygotowanej powierzchni nanonośnika, najczęściej w wyniku oddziaływań  $\pi$ - $\pi$  [52].

### 2.2.1. Grupa estrowa

Wiązanie estrowe tworzone pomiędzy dokсорubicyną a nanonośnikiem zazwyczaj osiągnięte jest w wyniku biokoniugacji pierwszorzędowej grupy hydroksylowej ( $-C=OCH_2OH$ ) chemioterapeutyku z grupą karboksylową znajdującą się na zakończeniach polimeru, np. PLGA otaczającego nanonośnik (Rys. 10 [28]) bądź pomię-

dzy grupą aminową DOX a hydroksylową PLGA (Rys. 11 [29]). W pierwszym przypadku proces zachodzi w obecności PyBroP/DMAP. Podczas reakcji pierwszorzędowa amina ugrupowania cukrowego w DOX chroniona jest przez Fmoc-Osu, a następnie odbezpieczana [28]. Z kolei druga możliwość polega na reakcji pierwszorzędowej aminy w cząsteczce leku z terminalną grupą hydroksylową w PLGA uprzednio poddanej aktywacji chloromrówczanem *p*-nitrofenyłu [29].



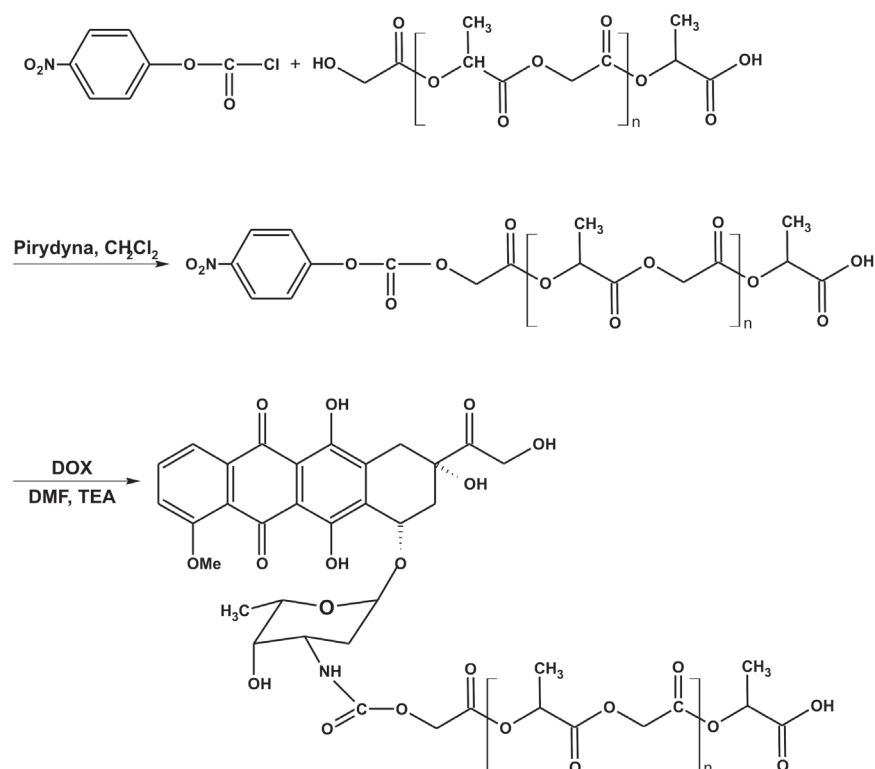
Rysunek 10. Schemat reakcji tworzenia wiązania estrowego DOX-PLGA (rysunek wykonany na podstawie [28])

Figure 10. The scheme of the formation of ester bound DOX-PLGA (the figure based on [28])

Yoo i współpracownicy w swoich pracach [28, 29] opisywali tworzenie wiązania estrowego pomiędzy doksorubicyną a PLGA na nanoosiłniku. Oddziaływanie było generowane odpowiednio między grupami hydroksylową-karboksylową [28] oraz aminową-hydroksylową [29]. Nowoczesne systemy dostarczania leku przebadano zarówno *in vivo* jak i *in vitro* na linii komórek nowotworowych HepG2. Wykazano, iż w obydwu przypadkach, lek połączony chemicznie z PLGA był lepiej wychwytywany przez chore tkanki, w porównaniu do chemioterapeutyku, który



był umieszczony wewnątrz nanocząstki dekorowanej PLGA. Dodatkowo, przyłączenie dokсорubicyny wiązaniem estrowym z polimerem charakteryzowało się większą pojemnością względem leku. Chemicznie związana DOX uwalniana była w sposób ciągły przez ponad miesiąc, podczas gdy niezwiązany chemioterapeutyk – w przeciągu ok. 5 dni (czyli znacznie szybciej) [28, 29]. Autorzy wykazali proporcjonalną zależność szybkości uwalniania leku z nanonośnika od masy cząsteczkowej polimeru pokrywającego jego powierzchnię. W badaniach *in vivo*, dokсорubicyna przenoszona za pomocą jedynie nośnika, podana jednorazowo wykazała zbliżoną aktywność do „wolnego” leku podawanego przez cały dzień [28].



Rysunek 11. Schemat reakcji tworzenia wiązania estrowego DOX-PLGA (rysunek wykonany na podstawie [29])

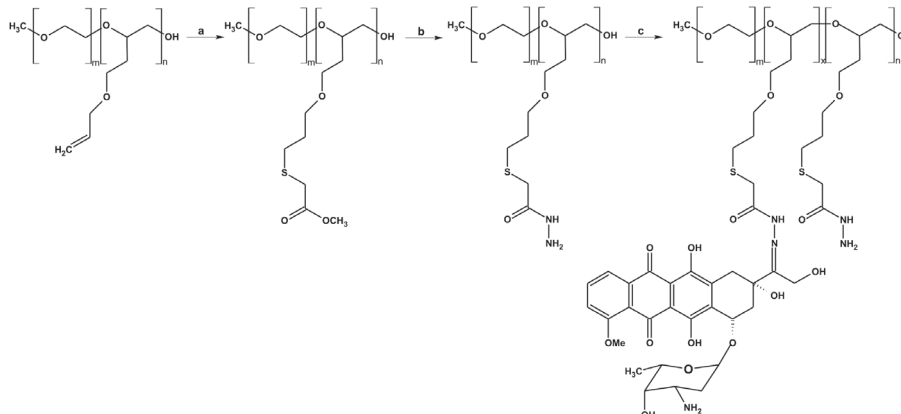
Figure 11. The scheme of the formation of ester bound DOX-PLGA (the figure based on [29])

Inne leki przeciwnowotworowe, np. paklitaksel, również mogą oddziaływać z nanonośnikiem poprzez wiązanie estrowe. Li i współpracownicy [53] przyłączyli paklitaksel wiązaniem estrowym do powierzchni polimerowego nośnika otoczonego poli-L-kwasem glutaminowym (PG). Zaobserwowano *in vivo* wzrost aktywności terapeutycznej leku w stosunku do raka jajnika typu OCa-1, w porównaniu do tradycyjnej terapii bazującej na podawaniu „zwykłego” PTX. Dodatkowo, stężenie

uwalnianego chemioterapeutyku z nanocząstki pozostawało względnie stałe w chorych tkankach: 489, 949 oraz 552 ng/g podczas dozowania odpowiednio w czasie 5, 48 i 144 h. Autorzy udowodnili, że połączenie PG-PTX wykazuje mniejszą toksyczność niż PTX. Wzrost aktywności nowatorskiego układu związany jest z jego lepszym wychwytem przez komórki nowotworowe oraz dłuższym czasem biodystrybucji poprzez poprawienie efektu EPR. Rezultat ten sugeruje, że zastosowanie labilnego wiązania estrowego pomiędzy nośnikiem polimerowym a chemioterapeutykiem jest użyteczną metodą do projektowania nowatorskich systemów dostarczania leków. Taki sam sposób łączenia paklitakselu z nośnikiem polimerowym zastosowała również grupa badawcza Milasa [54], która potwierdziła skuteczność metody.

### 2.2.2. Grupa *N*-acetylohydrazonu

Grupa *N*-acetylohydrazonu tworzona jest w wyniku sprzężenia grupy aldehydowej z hydrazydową. Takie połączenie pomiędzy nano-nośnikiem a lekiem wykazuje zwiększony poziom cytotoxycznosci w stosunku do niektórych linii komórek nowotworowych [55]. Dokсорубиcyna zawiera w swojej strukturze ugrupowanie aldehydowe pozwalające na łączenie leku z terminalnymi grupami hydrazydowymi znajdującymi się na powierzchni odpowiednio przygotowanych nano-nośników. Najczęściej grupy hydrazydowe pochodzą od polimerów otaczających nośniki [56], np. poli(allil glicydylu eter) [57] (Rys. 12 [57]), poli(tlenek etylenu)-polilaktyd [58], poli(tlenek etylenu)-poli(allil glicydylu eter) (PEO-PAGE) [56], HPMA [55].



Rysunek 12. Schemat reakcji tworzenia grupy *N*-acetylohydrazonu DOX-polimer (rysunek wykonany na podstawie [57])

Figure 12. The scheme of the formation of acethyl-hydrazone group DOX-polymer (the figure based on [57])

Reakcja sprzęgania leku z nanonośnikiem powinna być przeprowadzana w obecności buforu (np. octanowego [57], fosforanowego [56]) lub w warunkach bezwodnych, (np. mieszanina dimetylsulfoksydu z metanolem [57], DMSO/AcOH z dodatkiem bezwodnego siarczanu sodu [56]). Proces jest katalizowany kwasami, co pozwala na uzyskanie większej wydajności połączenia [57]. Uzyskane wiązanie jest nieaktywne w średnio kwaśnym środowisku. Cecha ta stanowi atut połączenia, gdyż wzmacnia selektywność uwalniania chemioterapeutyku w guzie, gdzie panuje niższe pH niż w osoczu krwi. Niska wartość pH w komórkach nowotworowych wywołana jest ich niedotlenieniem [57].

Układ micelarny na bazie amfifilowego, diblokowego kopolimeru zawierającego hydrofilowy politlenek etylenu i blok hydrofobowy zawierający DOX zaproponowany przez Vetvicka i współpracowników [57] wykazywał 20 razy mniejszą toksyczność niż „wolny” lek oraz wydłużony czas cyrkulacji w obiegu krwionośnym. W stosunku do komórek chłoniaka typu EL-4 T zaobserwowano obiecującą aktywność terapeutyczną. Mianowicie, 75% myszy uległa całkowitemu wyleczeniu. Dodatkowo, traktowanie myszy systemem micelarnym wywołało specyficzną odporność na powstawanie komórek nowotworowych [57].

Hrubý i inni [56] opisali tworzenie grupy *N*-acetylohydrazonu pomiędzy doksorubicyną a nośnikiem micelarnym dekorowanym PEO-PAGE. Autorzy wykazali, że lek uwalniany jest szybciej z nanonośnika przy pH odpowiadającym pH w endosomach (pH 5,0) niż przy pH osocza krwi (pH 7,4). Prawdopodobnie, efekt ten związany jest z przesunięciem równowagi pomiędzy wolnymi cząsteczkami DOX a związanymi z nośnikiem w kierunku uwalniania leku w pH 5,0 niż pH 7,4. Większa ilość wolnych molekuł DOX przy pH 5,0 wywołana jest wzrostem stopnia protonizacji ugrupowań aminowych i hydrazydowych kopolimeru. Yoo wraz z innymi [58] także zaprezentowali opisywany typ wiązania pomiędzy doksorubicyną a micelą polimerową uzyskaną na bazie poli(L-kwasu mlekowego) (PLA) oraz metoksy-glikolu polietylenowego (mPEG). Lek został przyłączony do terminalnych grup PLLA-PEG aktywowanych wstępnie hydrazyną tworzącą ugrupowanie hydrazydowe na nośniku reagującym następnie z grupami hydroksylowymi doksorubicyny. Autorzy wysunęli hipotezę stwierdzającą, że doksorubicyna połączona wiązaniem charakteryzującym się małą trwałością w kwaśnym środowisku, szybko dostarczana jest do wnętrza komórek nowotworowych poprzez mechanizm endocytozy i tam uwalniana działa silnie cytotoxicznie [58].

Leki na bazie platyny, podobnie jak doksorubicyna wykazują strukturalne właściwości umożliwiające połączenie nanonośnik-lek z wytworzeniem grupy *N*-acetylohydrazonu. Zespół badawczy Aryala [59] zaproponował biokonjugację kopolimeru PEG-PLA zakończonego ugrupowaniami hydrazydowymi PEG-PLA-NH-NH<sub>2</sub> z kwasem lewulinowym modyfikowanym analogiem cisplatyny Pt(IV). W wyniku połączenia dwóch komponentów w stosunku 2:1 powstał układ polimer-cisplatyna tworzący następnie nanocząsteczkę o rozmiarze 100 nm. Zastosowanie metody przyłączenia kowalencyjnego leku do powierzchni nanocząstki umożliwiło kontrolowanie ilości gromadzonych molekuł chemioterapeutyku na

nanonośniku. Nanocząstki polimerowe przenoszące cisplatinę polepszyły jej właściwości cytotoksyczne względem komórek nowotworowych jajników w porównaniu do tradycyjnej chemioterapii. Autorzy udowodnili mniejszą stratę leku podczas krążenia nanocząstki w obiegu krwionośnym w warunkach naturalnego pH. Sposób zaproponowany przez autorów [59], mający na celu szybkie uwalnianie dużej dawki leku z nanonośników do komórek nowotworowych zdecydowanie polepsza efektywność terapeutyczną chemioterapeutyku i rokuje dobrze na przyszłość leczenia.

Opisywany typ wiązania możliwy jest także pomiędzy molekułami paklitakselu a nanonośnikami, np. dendrymerem. Dendrymery poliamidoaminowe (PAMAM) okazują się być odpowiednimi nanonośnikami dla leków przeciwnowotworowych. Rdzeń zbudowany jest z alkilowanych cząsteczek diamin połączonych z trzeciorzędowymi aminami. Oddalone grupy aminowe nanonośnika umożliwiają łatwą funkcjonalizację z lekami. Modyfikacja powierzchni dendrymeru za pomocą paklitakselu została zastosowana w leczeniu raka jajników. Dodatkowo nanonośnik sfunkcjonalizowano celowanym ligandem w postaci białka LXW7 pozwalającym na wychwyt konkretnych komórek nowotworowych. Metodyka okazała się efektywna i spowodowała eliminację nowotworu. Dendrymer modyfikowany lekiem został wstrzyknięty w okolice guza. W kwaśnym pH, wobec komórek nowotworowych, wiązanie lek–nanonośnik uległo rozerwaniu, nastąpiło uwolnienie leku i jego aktywacja [60]. Rodrigues wraz ze współpracownikami [61] zaproponowali biokonjugację paklitakselu z polimerowym nośnikiem – glikolem polietylenowym PEG. Reakcja wymagała wstępnej modyfikacji cząsteczek chemioterapeutyku. Uzyskano maleimidowe pochodne paklitakselu poprzez przyłączenie ugrupowania maleimidowego do cząsteczki leku. Proces polegał początkowo na syntezie pochodnej estrowej leku w pozycji C-2'-OH w wyniku zastosowania kwasu 4-acetylbenzoesowego. Powstały produkt pośredni zapewniał obecność odpowiedniej grupy karbonylowej niezbędnej do połączenia pochodnej kwasu maleiminowego zawierającej ugrupowanie hydrazydowe. Uzyskana maleimidowa pochodna paklitakselu reagowała szybko i selektywnie poprzez podwójne wiązanie z grupą tiolową PEG tworzącą tioeterowe wiązanie i finalny produkt. Autorzy dowiedli skuteczność metody w sferze zachowania struktury i jednoczesnego polepszenia aktywności leku w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.

### 2.2.3. Grupa amidowa

Wiązanie amidowe powstaje w wyniku reakcji grupy karboksylowej z nukleofilem zawierającym pierwszorzędową aminę. Tworzenie wiązania amidowego pomiędzy SWCNTs a związkiem platyny zaproponował Feazel wraz ze współpracownikami [62]. Autorzy sfunkcjonalizowali jednościenne nanoruki węglowe fosfolipidem z aminą wewnątrz struktury. Łańcuch glikolu polietylenowego (PEG) pomiędzy grupą aminową a zakotwiczonym fosfolipidem polepszył rozpuszczalność SWCNTs oraz oddalił grupy funkcyjne od powierz-

chni nanorurek. Do tak przygotowanego materiału przyłączono związek  $c,c,t$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OEt)(O<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H)], jako „prolek”. Mechanizm reakcji opierał się na zastosowaniu EDC oraz *N*-hydroksysukcynimidu (NHS). Utworzony produkt pośredni łączył się wiązaniem amidowym z PEG na powierzchni SWCNTs. Uzyskany układ wychwytywany był i uwewnętrzniany w endosomach organizmu, w których niskie pH pozwoliło na uwolnienie aktywnego związku – cisplatyny (DDP). Zastosowanie opisanej metodyki pozwoliło na uniknięcie m.in. słabej cyrkulacji i dystrybucji leku w krwi oraz zmniejszyło toksyczność DDP względem komórek zdrowych [62].

Dostarczanie przez SWCNTs paklitakselu, przyłączonego wiązaniem amidowym, opisał w swojej pracy Liu wraz ze współpracownikami [63]. Początkowo sfunkcjonalizowano nanorurki węglowe za pomocą glikolu polietylenowego z ugrupowaniem aminowym (PEG-NH<sub>2</sub>). Z kolei do struktury cząsteczki leku wprowadzono grupę karboksylową w pozycji C-2'-OH. Przyłączenie PTX do sfunkcjonalizowanych nanorurek węglowych miało miejsce w obecności czynnika aktywującego EDC/NHS. Lek przyłączony do nanonośnika wykazywał w badaniach *in vivo* znacznie większą rozpuszczalność niż kliniczna forma PTX – Taxol. Toksyczność wspomnianych struktur PXL jest podobna. Układ SWCNTs-PXL w porównaniu do Taxolu charakteryzował się dłuższym czasem przebywania w obiegu krwionośnym, większym (ok. 10-krotnie) wychwytem przez komórki nowotworowe oraz silniejszym efektem terapeutycznym. Nowa formuła paklitakselu wykazywała zdolność powolnego zmniejszania objętości guza przy niewielkich dawkach chemioterapeutyku (5 mg/kg PTX). Wszystkie wspomniane właściwości przyczyniły się do zmniejszenia skutków ubocznych [63].

Inny lek, jakim jest doksorubicyna, także może zostać przyłączony do nanonośnika poprzez wiązanie amidowe. Liu wraz ze współpracownikami [64] zaproponowali biokoniugację DOX do powierzchni poliamidoaminowego dendrymeru. Skuteczność oraz efektywność uzyskanego układu dostarczania leku określono względem komórek nowotworowych działy linii Ca9-22. Cytotoksyczność przenieszonego chemioterapeutyku zwiększyła się w porównaniu do terapii z wykorzystaniem „wolnego” leku.

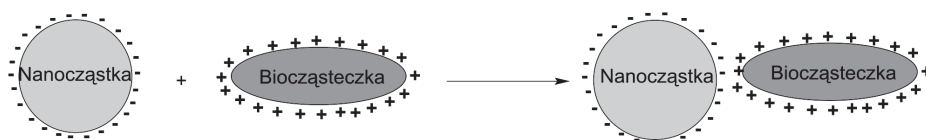
#### 2.2.4. Grupa disiarczkowa

Wiązanie disiarczkowe pomiędzy lekiem a nanonośnikiem jest odpowiednie w celu selektywnego dostarczenia i kumulowania wysokiego stężenia chemioterapeutyku. Większość leków i nanonośników nie posiada w swojej budowie grup tiolowych, jednakże odpowiednia ich modyfikacja pozwala na uzyskanie wiązania disiarczkowego. Struktury chemioterapeutyków zawierające ugrupowania aminowe bądź karboksylowe wiążą np. peptydy, które są nośnikami grup tiolowych. Układ taki umożliwia utworzenie wiązania disiarczkowego [12].

Paklitaxel połączony wiązaniem disiarczkowym do powierzchni jednościennej nanorurek węglowych zastosowano w leczeniu białaczki linii L1210FR. Łącznik disiarczkowy został przyłączony w pozycji C-2' leku. Z drugiej strony nośnik – nanorurki węglowe poddano modyfikacji poprzez: utlenienie, wprowadzenie ugrupowań amidowych oraz funkcjonalizację ugrupowaniami aminowymi. Ponadto autorzy zastosowali biotynę, jako celowany ligand. Traktowanie komórek białaczkowych nowoczesnym układem dostarczania paklitakselu skutecznie je niszczyło. Chemioterapeutyk uwalniany był w postaci aktywnej poprzez rozerwanie wiązania disiarczkowego po uwewnętrznieniu nowatorskiego układu [65].

### 2.2.5. Adsorpcja

Chemioterapeutyki gromadzone są także na zewnętrznej powierzchni nano-nośników w wyniku adsorpcji fizycznej, dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym pomiędzy powierzchnią nośnika a biocząsteczką (Rys. 13 [66]).



Rysunek 13. Oddziaływanie elektrostatyczne nanocząstka-biocząsteczka (rysunek wykonany na podstawie [66])

Figure 13. Electrostatic interaction of nanomolecule-biomolecule (the figure based on [66])

Kataoka wraz ze współpracownikami [67] opisali adsorpcję fizyczną dokсорubicyny na powierzchni nośnika micelnego syntezowanego z kopolimeru blokowego PEG–PBLA. Układ lek–nanonośnik uzyskano w wyniku oddziaływań  $\pi$ - $\pi$  pomiędzy ugrupowaniem antracyklinowym DOX a segmentami benzyłowymi PBLA. Lek przenoszony za pomocą polimerowej miceli wykazywał większą aktywność w porównaniu do wolnego leku. Micele formowane na bazie PEG–PBLA wydłużały czas cyrkulacji DOX w krwiobiegu, prawdopodobnie dzięki sterycznemu mechanizmowi stabilizującemu i maskującemu. Greisha wraz ze współpracownikami [68] wykazali 13-krotny wzrost stężenia leku wewnątrz guza S-180, podczas przenoszenia dokсорubicyny adsorbowanej na powierzchni miceli polimerowej w porównaniu do wolnego cytostatyku. Nowy system przenoszenia leku charakteryzował się polepszeniem właściwości terapeutycznych, przy jednoczesnym obniżeniu skutków ubocznych [67].

Z kolei grupa Ali-Boucetta [69] zaproponowała niekwalencyjne połączenie DOX z nanorurkami węglowymi. Wielościenne nanorurki węglowe funkcjonalizowane za pomocą trójblokowego kopolimeru (Pluronic F127) charakteryzowały się większym rozproszeniem w środowisku wodnym, co pozwoliło na uzyskanie supramolekularnego kompleksu z lekiem przeciwnowotworowym za sprawą oddziaływań



$\pi$ - $\pi$ . Autorzy udowodnili wzrost cytotoksyczności DOX w połączeniu z nanorurkami węglowymi względem komórek raka piersi MCF7 niż w przypadku działania samego chemioterapeutyku. Autorzy udowodnili, że zastosowanie MWCNTs ułatwiło dostarczenie leku do chorych tkanek przez bariery biologiczne oraz polepszyło jego aktywność. Skuteczność wykorzystania kompleksu MWCNTs-DOX determinowana była poprzez efektywne i następujące w odpowiednim momencie uwalnianie leku [69]. Hester i inni [70], również zaprezentowali niekowalencyjny kompleks DOX z jednościenneymi nanorurkami węglowymi. Dodatkowo do nanonośnika zawierającego ugrupowania karboksylowe przyłączyli monoklonalne antyciało, jako celowany ligand. Przeprowadzone badania przez autorów udowodniły, że SWCNTs mogą być stosowane do usprawnienia przenoszenia leków przeciwnowotworowych [70]. Efektywność i podwyższoną aktywność DOX adsorbowanej na powierzchni nanorurek węglowych sfunkcjonalizowanych polisacharydem potwierdziła także grupa Hanga [71], modyfikowanych PEG – grupa Liu [72], zaś amfifilowym kopolimerem PEG<sub>44</sub>PPS<sub>20</sub> – grupa Crescenzo [73].

Paklitaksel, także z powodzeniem adsorbowany jest na powierzchni odpowiednio modyfikowanego nanonośnika. Tian wraz ze współpracownikami [74] „osadzili” PTX na powierzchni nanorurek węglowych poprzez oddziaływania  $\pi$ - $\pi$ . MWCNTs wstępnie zmodyfikowano, aby układ MWCNTs-PTX był skuteczny względem komórek nowotworowych. Funkcjonalizacja obejmowała kowalencyjne przyłączenie polietylenoiminy do utlenionej powierzchni nanonośnika i następnie utworzenie wiązania amidowego pomiędzy sfunkcjonalizowanymi MWCNTs a kwasem foliowym, jako celowanym ligandem. Przeprowadzone przez badaczy analizy wykazały wzrost rozpuszczalności leku przenoszonego w układzie MWCNTs-PTX oraz docieranie chemioterapeutyku tylko do komórek nowotworowych. Paklitaksel przenoszony za pomocą sfunkcjonalizowanych nanorurek węglowych wykazywał większą aktywność *in vitro* w porównaniu do terapii wykorzystującej sam lek. Polepszenie właściwości cytotoksycznych pozwala na stwierdzenie, że właściwie zmodyfikowane CNTs są odpowiednimi nośnikami leków przeciwnowotworowych [74].

Adsorpcja kompleksów platyny związana jest ze stabilnością ligandów azotowych i mobilnością jonów chlorkowych. Pozytywnie naładowany akwakompleks cisplatyny jest dzięki temu silnie adsorbowany na nanonośnikach. Adsorpcja cisplatyny w dużej mierze zależy od oddziaływań elektrostatycznych [75]. Grupa badawcza Barrouga [76] zajmowała się adsorpcją cisplatyny na nanonośnikach. Autorzy wykazali wzrost adsorpcji leku na powierzchni nośnika oraz nieznaczny wzrost szybkości uwalniania leku wraz z temperaturą. Cytotoksyczność chemioterapeutyku testowana była *in vitro* na komórkach nowotworowych kostniakomiesaka linii K8. Oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy cisplatyną a powierzchnią nanocząstki nie wpłynęły na pogorszenie aktywności stosowanego chemioterapeutyku. Li i współpracownicy [77] adsorbowali cisplatynę na nanocząstkach hydroksyapatytu (Fe5, Fe/Ca=5%). Dodatkowo wykonali próbę porównawczą umieszczając uzyskany kompozyt DDP-Fe5 wewnątrz mikrosfery PLGA. Lek uwalniany był zdecydowanie szybciej z DDP-Fe5 (25 dni) niż z DDP-Fe5-PLGA (55 dni). Kom-



pozyt Fe5/PLGA charakteryzował się korzystnymi właściwościami pozwalającymi na odpowiednie uwalnianie DDP w porównaniu do samego polimeru, co wpłynęło obiecująco na zastosowanie tej nowej formy cisplatyny. Analog cisplatyny jakim jest karboplatyna wprowadziła na powierzchnię nanorurek węglowych grupa Haase [78]. Proces adsorpcji leku okazał się pomyślny, ponieważ chemioterapeutyk skutecznie hamował wzrost guza. Efektywność przenieszonego leku była większa w porównaniu do zastosowania „samej” karboplatyny.

Mimo wielu literaturowych opisów oddziaływań elektrostatycznych leków przeciwnowotworowych z nanonośnikami, w praktyce bardziej preferowane są wiązania kowalencyjne, ze względu na możliwość kontrolowania ilości oraz orientacji łączonych indywiduów podczas prowadzenia reakcji [66].

## PODSUMOWANIE

Opisane powyżej sposoby wprowadzania leków przeciwnowotworowych na powierzchnię nanonośników to tylko nieznaczna grupa możliwości. W literaturze spotyka się także m.in. jonowe kompleksy cytostatyków z nośnikami, np. cisplatyny z nanocząsteczką syntetyzowaną na bazie kwasu hialuronowego [79] czy doksorubicyny z kompleksem bloku jonomerowego i surfaktantem [80]. Autorzy udowodnili, że zastosowane przez nich nanonośniki są odpowiednimi układami do przenoszenia i dystrybucji leków przeciwnowotworowych [79, 80].

Funkcjonalizacja kowalencyjna nanonośników za pomocą 1,3-dipolarnej cykloaddycji jest szeroko stosowanym mechanizmem w biokoniugacji ugrupowań niezbędnych do przenoszenia terapeutyków. Terminalne grupy aminowe na powierzchni nanonośników stanowią idealne, reaktywne centra do przyłączenia cząsteczek funkcyjnych [81]. Pastorin wraz ze współpracownikami zaprezentowali wykorzystanie reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji w celu funkcjonalizacji MWCNTs i wygenerowania odpowiednich grup łączących się z uaktywnionymi ugrupowaniami karboksylowymi leku – metotreksatem. Opisane połączenie zmniejszyło wewnątrzkomórkową barierę wychwytu czynnika cytotoksycznego i zwiększyło efektywność działania [18].

Ciekawe wydają się być połączenia dwóch leków przeciwnowotworowych z jednym nanonośnikiem. Kilka nośników leków wykazuje charakterystyczne właściwości pozwalające na łączenie różnych chemioterapeutyków, np. nanocząstki polimerowe, liposomy. Celem metodyki jest konkurencyjne dostarczanie chemioterapeutyków do komórek nowotworowych i jednoczesny wzrost efektywności terapii. Ważne jest, aby leki łączone były za pomocą wiązań łatwo podlegających hydrolizie w celu niezależnego gromadzenia leków wewnątrz komórek nowotworowych po ich uwolnieniu [11]. Metodyka bazująca na dostarczaniu większej ilości leków na jednym nanonośniku może wpływać na zniesienie oporności lekowej i skutkować zdolnością do regulowania odpowiedniej i wystarczającej dawki dostarczanego chemioterapeutyku [82].

Aryal wraz ze współpracownikami [11] zaprezentowali gromadzenie połączonych kowalencyjnie leków przeciwnowotworowych: paklitakselu z chlorowodorkiem gemcytabiny (GEM) na powierzchni nanocząstki. Podczas biokoniugacji leków autorzy musieli zmierzyć się z problemem różnicy hydrofobowości pomiędzy chemioterapeutykami. Paklitaksel modyfikowano poprzez przekształcenie najbardziej reaktywnej grupy hydroksylowej 2'-OH na karboksylową i następnie wprowadzono bezwodnik glutarowy (GA). Grupa karboksylowa związku pośredniego reagowała następnie z GEM. Cytotoksyczność leków w porównaniu do ich wolnych odpowiedników znacznie wzrosła względem guza prostaty XPA3 [11]. Podobne strategie mogą być także stosowane dla innych rodzajów i połączeń leków, tak jak zaprezentowali Hang i inni łącząc dokсорubicynę z docetakselem [82].

## WNIOSKI

Synteza nowoczesnych systemów dostarczania leków okazuje się być bardzo ważna w dostarczaniu chemioterapeutyków. Użycie nanonośników umożliwia osiągnięcie znacznie większej aktywności leków w porównaniu do ich samodzielnego działania. Nanonośniki całkowicie izolują cząsteczki leku przed środowiskiem biologicznym, co minimalizuje degradację enzymatyczną chemioterapeutyku [7]. Zastosowanie nanonośników w celu dostarczania leków zwiększa ich rozpuszczalność i jednocześnie wydłuża czas dystrybucji w obiegu krwionośnym. Przełamuje typowe bariery biologiczne takie jak krew-mózg, co umożliwia docieranie leku w miejsca słabo dostępne dla klasycznej chemioterapii. Nowatorski system dostarczania leków w postaci celowany ligand-nanonośnik-lek spełnia wszystkie wymagania efektywnego i bezpiecznego leczenia przeciwnowotworowego: stężenie przenoszono leku jest adekwatne w organizmie i zapewnia efektywną dawkę; cytotoksyczność chemioterapeutyku jest wysoka w stosunku do komórek nowotworowych [83]. Dostarczanie leków za pomocą nanonośników otwiera drogę do leczenia chorób charakteryzujących się tzw. opornością wielolekową [6].

Lek może być gromadzony na powierzchni nanonośnika bądź w jego wnętrzu. Odpowiednia modyfikacja nośników pozwala na chemiczną biokoniugację leku w wyniku tworzenia grup m.in.: amidowej, estrowej, disiarczkowej czy *N*-acetylohydrazonu. Każdy typ reakcji wymaga wstępnego przygotowania powierzchni nanonośnika poprzez wygenerowanie odpowiednich grup funkcyjnych zapewniających możliwość danego połączenia. Proces syntezy lek-nanonośnik uzależniony jest także w dużej mierze od struktury stosowanego chemioterapeutyku. Możliwe jest także niekowalencyjne oddziaływanie nanonośnika z czynnikiem cytotoksycznym, które jednak nie zapewnia zbyt dużej stabilności połączenia oraz ilościowej kontroli gromadzonych cząsteczek leku.

Aktualne badania nad funkcjonalizacją nanonośników celowanymi ligandami (przeciwciałami, kwasem foliowym, białkami) oraz lekami cytostatycznymi pozwalają na selektywne dostarczenie odpowiedniego stężenia chemioterapeutyku

do konkretnej komórki nowotworowej [9, 31]. Na podstawie przytoczonych przykładów zarówno w części I pracy jak i II można stwierdzić, że celowana terapia przeciwnowotworowa stanowi przyszłościowy kierunek rozwoju leczenia chorób nowotworowych.

Praca jest finansowana z grantu NCN DEC-2011/01/B/ST5/01192.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R. Panchagnula, *Int. J. Pharm.*, 1998, **172**, 1.
- [2] L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, **56**, 1649.
- [3] R. Sinha, G.J. Kim, S. Nie, D.M. Shin, *Mol. Cancer Ther.*, 2006, **5**, 1909.
- [4] A. Bianco, K. Kostarelos, C.D. Partidos, M. Prato, *Chem. Commun.*, 2005, **5**, 571.
- [5] L. Juillerat-Jeanneret, *Drug Discov. Today*, 2008, **13**, 1099.
- [6] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nature Nanotech.*, 2007, **2**, 751.
- [7] V. Torchilin, Imperial College Press, London, 2006, **1**, 1.
- [8] G.A. Hughes, *Nanomedicine: Nanotechn., Biol. Med.*, 2005, **1**, 22.
- [9] D.R. Khan, *J. Cancer Sci. Ther.*, 2010, **2**, 058.
- [10] R. Singh, J.W. Lillard, *Exp. Molec. Path.*, 2009, **86**, 215.
- [11] S. Aryal, C.M.J. Hu, L. Zhang, *Small*, 2010, **13**, 1442.
- [12] K.R. West, S. Otto, *Curr. Drug Disc. Tech.*, 2005, **2**, 123.
- [13] K.M. Werengowska, M. Wiśniewski, A.P. Terzyk, N. Gurtowska, T.A. Drewa, *Wiad. Chem.*, 2011, **65**, 887.
- [14] E. Pawełczyk, M. Zając, *Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Poznań*, 1995, 5–7, 340.
- [15] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, *Pharmacol. Rev.*, 2004, **56**, 185.
- [16] J. Verweij, M. Clavel, B. Chevalier, *Annals of Oncology*, 1994, **5**, 495.
- [17] L.M. Pasetto, M.R. D'Andrea, A.A. Brandes, E. Rossi, S. Monfardini, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2006, **60**, 59.
- [18] G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J.P. Briand, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, *Chem. Commun.*, 2006, **11**, 1182.
- [19] Y. Ren, G. Pastorin, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 2031.
- [20] A. Sparreboom, C.D. Scripture, V. Trieu, *Clin. Cancer Res.*, 2005, **11**, 4136.
- [21] L. Kelland, *Nature Rev.*, 2007, **7**, 573.
- [22] C. Tripisciano, E. Borowiak-Palen, *Phys. Stat. Sol. (b)*, 2008, **10**, 1979.
- [24] K. Malinowska, R. Modranka, J. Kędziora, *Pol. Merk. Lek.*, 2007, **23**, 165.
- [25] A.A. Bhirde, A.A. Sousa, V. Patel, A.A. Azari, J.S. Gutkind, R.D. Leapman, J.F. Rusling, *Nanomedicine (Lond)*, 2009, **4**, 763.
- [26] A. Sparreboom, K. Nooter, J. Verweij, John Wiley & Sons, Ltd., 2002, **84E**, 1333.
- [27] E. Czeczuga-Semeniuk, S. Wołczyński, M. Dąbrowska, J. Dziecioł, T. Anchim, *Folia Histochem. Cytobiol.*, **42**, 221.
- [28] H.S. Yoo, K.H. Lee, J.E. Oh, T.G. Park, *J. Control. Release*, 2000, **68**, 419.
- [29] H.S. Yoo, J.E. Oh, K.H. Lee, T.G. Park, *Pharm. Res.*, 1999, **16**, 1114.
- [30] S.K. Vashist, D. Zheng, G. Pastorin, K. Al-Rubeaan, J.H.T. Luong, F.S. Sheu, *Carbon*, 2011, **49**, 4077.

- [31] T.A. Hilder, J.M. Hill, *Small*, 2009, **5**, 300.
- [32] M. Yudasaka, K. Ajima, K. Suenaga, T. Ichihashi, A. Hashimoto, S. Iijima, *Chem. Phys. Lett.*, 2003, **380**, 42.
- [33] C. Tripisciano, K. Kraemer, A. Taylor, E. Borowiak-Palen, *Chem. Phys. Lett.*, 2009, **478**, 200.
- [34] C. Tripisciano, S. Costa, R.J. Kalenczuk, E. Borowiak-Palen, *Eur. Phys. J. (b)*, 2010, **75**, 141.
- [35] E.C. Gryparis, M. Hatziapostolou, E. Papadimitriou, K. Avgoustakis, *Eur. J. Pharm Biopharm.*, 2007, **67**, 1.
- [36] N. Nishiyama, K. Kataoka, *J. Control. Release*, 2001, **74**, 83.
- [37] Y. Mizumura, Y. Matsumura, T. Hamaguchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, T. Kawaguchi, W.J.M. Hrushesky, F. Moriyasu, T. Kakizoe, *Jpn. J. Cancer Res.*, 2001, **92**, 328.
- [38] A. Schroeder, R. Honen, K. Turjeman, A. Gabizon, J. Kost, Y. Barenholz, *J. Control. Release*, 2009, **137**, 63.
- [39] M.S. Newman, G.T. Colbern, P.K. Working, C. Engbers, M.A. Amantea, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1999, **43**, 1.
- [40] S. Hampel, D. Kunze, D. Haase, K. Kramer, M. Rauschenbach, M. Ritschel, A. Leonhardt, J. Thomas, S. Oswald, V. Hoffmann, B. Buchner, *Nanomedicine (Lond)*, 2008, **3**, 175.
- [41] S. Mitra, U. Gaur, P.C. Ghosh, A.N. Maitra, *J. Control. Release*, 2001, **74**, 317.
- [42] F. Lince, S. Bolognesi, B. Stella, D.L. Marchisio, F. Dosio, *Chem. Eng. Res. Des.*, 2011, **89**, 2410.
- [43] H. Park, J. Yang, J. Lee, S. Haam, I.H. Choi, K.H. Yoo, *ACS Nano*, 2009, **3**, 2919.
- [44] Y. Matsumura, M. Gotoh, K. Muro, Y. Yamada, K. Shirao, Y. Shimada, M. Okuwa, S. Matsumoto, Y. Miyata, H. Ohkura, K. Chin, S. Baba, T. Yamao, A. Kannami, Y. Takamatsu, K. Ito, K. Takahashi, *Annals of Oncology*, 2004, **15**, 517.
- [45] A.A. Gabizon, *Cancer Invest.*, 2001, **19**, 424.
- [46] K. Kataoka, T. Matsumoto, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, G.S. Kwon, *J. Control. Release*, 2000, **64**, 143.
- [47] J.M. Koziara, P.R. Lockman, D.D. Allen, R.J. Mumper, *J. Control. Release*, 2004, **99**, 259.
- [48] G. Ruan, S.S. Feng, *Biomaterials*, 2003, **24**, 5037.
- [49] C. Fonseca, S. Simões, R. Gaspar, *J. Control. Release*, 2002, **83**, 273.
- [50] T. Hamaguchi, K. Kato, H. Yasui, C. Morizane, M. Ikeda, H. Ueno, K. Muro, Y. Yamada, T. Okusaka, K. Shirao, Y. Shimada, H. Nakahama, Y. Matsumura, *Br. J. Cancer*, 2007, **97**, 170.
- [51] T.Y. Kim, D.W. Kim, J.Y. Chung, S.G. Shin, S.C. Kim, D.S. Heo, N.K. Kim, Y.J. Bang, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 3708.
- [52] Z. Liu, J.T. Robinson, S.M. Tabakman, K. Yang, H. Dai, *Materials Today*, 2011, **14**, 316.
- [53] C. Li, R.A. Newman, Q.P. Wu, S. Ke, W. Chen, T. Hutto, Z. Kan, M.D. Brannan, C.C.S. Wallace, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2000, **46**, 416.
- [54] L. Milas, K.A. Mason, N. Hunter, C. Li, and S. Wallace, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 2003, **55**, 707.
- [55] T. Etrych, T. Mrkvan, P. Chytil, C. Koňák, B. Říhová, K. Ulbrich, *J. Appl. Polymer Sci.*, 2008, **109**, 3050.
- [56] M. Hrubý, C. Koňák, K. Ulbrich, *J. Control. Release*, 2005, **103**, 137.
- [57] D. Vetvicka, M. Hrubý, O. Hovorka, T. Etrych, M. Vetrík, L. Kovar, M. Kovar, K. Ulbrich, B. Říhová, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 2090.
- [58] H.S. Yoo, E.A. Lee, T.G. Park, *J. Control. Release*, 2002, **82**, 17.
- [59] S. Aryal, C.M.J. Hu, L. Zhang, *ACS Nano.*, 2010, **4**, 251.
- [60] E. Tsai, *Cosmos*, 2011, **8**, 1.
- [61] P.C.A. Rodrigues, K. Scheuermann, C. Stockmar, G. Maier, H.H. Fiebig, C. Unger, R. Mülhaupt, F. Kratza, *Bioor. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 355.
- [62] R.P. Feazell, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, S.J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8438.

- [63] Z. Liu, K. Chen, C. Davis, S. Sherlock, Q. Cao, X. Chen, H. Dai, *Cancer Res*, 2008, **68**, 6652.
- [64] P.S. Lai, P.J. Lou, C.L. Peng, C.L. Pai, W.N. Yen, M.Y. Huang, T.H. Young, M.J. Shieh, *J. Control. Release*, 2007, **122**, 39.
- [65] J. Chen, S. Chen, X. Zhao, L.V. Kuznetsova, S.S. Wong, I. Ojima, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, **130**, 16778.
- [66] L. Wang, W. Zhao, W. Tan, *Nano Res.*, 2008, **1**, 99.
- [67] K. Kataoka, T. Matsumoto, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, G.S. Kwon, *J. Control. Release*, 2000, **64**, 143.
- [68] K. Greish, T. Sawa, J. Fang, T. Akaike, H. Maeda, *J. Control. Release*, 2004, **97**, 219.
- [69] H. Ali-Boucetta, K.T. Al-Jamal, D. McCarthy, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos, *Chem. Commun.*, 2008, **4**, 459.
- [70] E. Heister, V. Neves, C. Tilmaciu, K. Lipert, V. Sanz Beltrán, H.M. Coley, S.R.P. Silva, J. McFadden, *Carbon*, 2009, **47**, 2152.
- [71] X. Zhang, L. Meng, Q. Lu, Z. Fei, P.J. Dyson, *Biomaterials*, 2009, **30**, 6041.
- [72] Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, *ACS Nano*, 2007, **1**, 50.
- [73] A. Di Crescenzo, D. Velluto, J.A. Hubbell, A. Fontana, *Nanoscale*, 2011, **3**, 925.
- [74] Z. Tian, Y. Shi, M. Yin, H. Shen, N. Jia, *Nano Biomed. Eng.*, 2011, **3**, 155.
- [75] B. Palazzo, M. Iafisco, M. Laforgia, N. Margiotta, G. Natile, C.L. Bianchi, D. Walsh, S. Mann, N. Roveri, *Adv. Funct. Mater.*, 2007, **17**, 2180.
- [76] A. Barroug, L.T. Kuhn, L.C. Gerstenfeld, M.J. Glimcher, *J. Orthop. Res.*, 2004, **22**, 703.
- [77] Y. Li, S. Lim, C.P. Ooi, *Pharm. Res.*, 2012, **29**, 756.
- [78] M. Arlt, D. Haase, S. Hampel, S. Oswald, A. Bachmatiuk, R. Klingeler, R. Schulze, M. Ritschel, A. Leonhardt, S. Fuessel, B. Büchner, K. Kraemer and M.P. Wirth, *Nanotechnology*, 2010, **21**, 1.
- [79] Y.I. Jeong, S.T. Kim, S.G. Jin, H.H. Ryu, Y.H. Jin, T.Y. Jung, I.Y. Kim, S. Jung, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**, 1268.
- [80] T.K. Bronich, A. Nehls, A. Eisenberg, V.A. Kabanov, A.V. Kabanov, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 1999, **16**, 243.
- [81] M. Foldvari, M. Bagonluri, *Nanomedicine: Nanotechn., Biol. Med.*, 2008, **4**, 183.
- [82] L. Zhang, A.F. Radovic-Moreno, F. Alexis, F.X. Gu, P.A. Basto, V. Bagalkot, S. Jon, R.S. Langer, O.C. Farokhzad, *ChemMedChem*, 2007, **2**, 1268.
- [83] E.S. Kawasaki, A. Player, *Nanomedicine: Nanotechn., Biol. Med.*, 2005, **1**, 101.

Praca wpłynęła do Redakcji 5 czerwca 2012